

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Bc. Gabriela Presová**

PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE BUNĚČNÝCH MODELŮ LYSOSOMÁLNÍCH  
DĚDIČNÝCH ONEMOCNĚNÍ - MUKOPOLYSACHARIDOS

Preparation and Characterization of Cell Models of Lysosomal  
Hereditary Diseases - Mucopolysaccharidoses

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Robert Dobrovolný, Ph.D.

Konzultanti: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

RNDr. Asfaw Befekadu, CSc.

Praha 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Dále prohlašuji, že tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, dne 15. 6. 2020

.....

Gabriela Presová

## Abstrakt

Mukopolysacharidosy jsou skupinou nemocí, které patří mezi lysosomální střádavá onemocnění. Jedná se o vzácné monogenní multisystémové poruchy, jejichž společným znakem je mutace genu, která vede k deficitu lysosomálního enzymu účastníciho se degradace glykosaminoglykanů. Nedegradované glykosaminoglykany se pak akumulují v tkáních a orgánech, kde způsobují progresivní poškození.

U většiny mukopolysacharidos není dostupný účinný způsob léčby, navíc je jejich výzkum komplikován nízkým výskytem v populaci a typem postižovaných tkání. Zvířecí modely těchto lidských onemocnění se využívají pro studium účinnosti nových terapeutických přístupů, mají však řadu omezení především kvůli mezidruhovým rozdílům v patogenezi a katabolických drahách akumulovaných substrátů, proto jsou v mnoha ohledech zastupovány lidskými buněčnými modely.

V této práci je popsán vývoj buněčných modelů čtyř typů mukopolysacharidos (MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI). Inaktivace genů souvisejících s těmito onemocněními (*GNS*, *GALNS*, *GLBI*, *ARSB*) bylo dosaženo technologií CRISPR/Cas9, při které jsou plasmidy obsahující specifické inserty dopraveny elektroporací do lidských indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC).

Izolované klony představující iPSC modely zmíněných onemocnění byly charakterizovány Sangerovou sekvenační metodou, testováním enzymatických aktivit a detekcí vybraných znaků pluripotence.

Chondrogenní diferenciaci charakterizovaných iPSC umožňuje porovnání fenotypů modelovaných mukopolysacharidos a detekci míry akumulace glykosaminoglykanů v jednom z buněčných typů, které tato onemocnění postihují nejvíce.

Takto připravené buněčné modely mukopolysacharidos představují slibný nástroj pro jejich studium patogeneze specifického tkáňového poškození a testování účinnosti nových terapeutických přístupů.

## Klíčová slova

Buněčný model, CRISPR/Cas9, chondrogenní diferenciaci, glykosaminoglykany, inaktivace genu, indukované pluripotentní kmenové buňky, lysosomální střádavá onemocnění, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, mukopolysacharidosy

## **Abstract**

Mucopolysaccharidoses are a group of diseases that belong to lysosomal storage disorders. A common sign of these monogenic multisystem diseases is a gene mutation leading to a deficiency of the lysosomal enzyme participating in glycosaminoglycan degradation. It results to their accumulation in the tissues and organs, where they cause a progressive damage.

There is no efficient treatment available for most mucopolysaccharidoses. Moreover, the research is complicated because of the low prevalence and type of affected tissues. Animal models of these human diseases are used for an evaluation of newly developed therapeutic approaches. However, they also have many limitations due to the different pathogenesis and catabolic pathways of the accumulated substrates between humans and animals. Therefore, animal models are replaced by human cell models.

In this thesis, the development of four mucopolysaccharidoses human cell models is reported (MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI). Corresponding genes (*GNS*, *GALNS*, *GLB1*, *ARSB*) were inactivated using CRISPR/Cas9 technology, where plasmids containing specific inserts are delivered to the target human induced pluripotent stem cells (iPSC), using electroporation.

Isolated clones, which represent iPSC disease models, were characterized by Sanger sequencing, enzyme assays and staining of some pluripotent markers.

Chondrogenic differentiation of characterized iPSC allows phenotype comparison of the mucopolysaccharidoses and detection of glycosaminoglycan accumulation in one of the cell types most affected by mucopolysaccharidoses.

Thus, prepared human cell models of mucopolysaccharidoses represent a promising tool for understanding the disease pathogenesis of specific tissue damage and the study of new therapeutic approaches.

## **Key words**

Cell model, CRISPR/Cas9, chondrogenic differentiation, gene inactivation, glycosaminoglycans, induced pluripotent stem cells, lysosomal storage disorders, MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB, MPS VI, mucopolysaccharidoses

## **Poděkování**

Touto cestou bych ráda poděkovala RNDr. Robertovi Dobrovolnému, Ph.D., vedoucímu mé diplomové práce, za možnost pracovat pod jeho vedením, představení této problematiky, sdílení jeho vědeckých dovedností, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Velké díky patří také mým konzultantům doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a RNDr. Asfaw Befekadu, CSc. za cenné rady a pomoc spojenou s formálními záležitostmi práce.

Dále bych chtěla poděkovat kolegyním a kolegům z Laboratoře pro studium vzácných nemocí, Laboratoře genetiky a bioinformatiky, Enzymologické laboratoře, Laboratoře DNA diagnostiky a Laboratoře biologie a patologie oka za spolupráci, praktické rady a příjemné pracovní prostředí.

Speciální poděkování patří mé rodině, zejména rodičům, sourozencům a mému partnerovi za jejich neustálou podporu, lásku, trpělivost a motivaci v průběhu studia.

## Seznam zkratek

4MU	4-Methylumbelliferon
4NC	4-Nitrokatechol
ALP	Alkalická fosfatasa (alkaline phosphatase)
Arg	Arginin
ARSB	Arylsulfatasa B
ATP	Adenosintrifosfát
BMP	Kostní morfogenní protein (bone morphogenic protein)
BSA	Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
Cas	Proteiny asociované s CRISPR (CRISPR-associated proteins)
CD	Diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CLEAR	Koordinovaná lysosomální exprese a regulace (coordinated lysosomal expression and regulation)
CMA	Chaperony zprostředkovaná autofagie (chaperone-mediated autophagy)
CNS	Centrální nervová soustava
CRISPR	Nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
crRNA	CRISPR RNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-fenyлиндol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Deoxynukleotid trifosfát (deoxynucleotide triphosphate)
DSB	Dvouřetězcové zlomy (double-strand breaks)
dsDNA	Dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)
DTT	Dithiotreitol
ECM	Extracelulární matrix
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELS	Endosomálně-lysosomální systém
ERT	Enzymová substituční terapie (enzyme replacement therapy)
ESC	Embryonální kmenové buňky (ESC, embryonic stem cells)

FBS	Fetální hovězí sérum (fetal bovine serum)
FGF	Růstový faktor fibroblastů (fibroblast growth factor)
GAG	Glykosaminoglykany
GALNS	<i>N</i> -acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasa
GFP	Zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
GLB1	Galaktosidasa beta 1
Gln	Glutamin
Glu	Glutamát
GNS	<i>N</i> -acetylglukosamin-6-sulfát sulfatasa
GP	Glykoproteínosa
gRNA	Naváděcí RNA (guide RNA)
GSD	Glykogenosa (glycogen storage disease)
GUSB	Glukuronidasa beta
HDR	Homologií řízená oprava (homology-directed repair)
HEXB	Hexosaminidase beta
HGSNAT	Heparan-alfa-glukosaminid <i>N</i> -acetyltransferasa
HYAL1	Hyaluronidasa 1
CHS	Chondroitin-6-sulfát
IDS	Iduronát 2-sulfatasa
IDUA	Alfa-L-iduronidasa
IGF	Růstový faktor podobný insulinu (insuline-like growth factor)
IgG	Imunoglobulin G
IL2	Interleukin 2
iMEF	Ozářené myši embryonální fibroblasty (irradiated mouse embryonic fibroblasts)
iPSC	Indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
ITS	Insulin-transferin-selen
LAMP	Lysosomální membránový protein typu (lysosome-associated membrane protein)
LSD	Lysosomální střádavá onemocnění (lysosomal storage diseases)
Lys	Lysin

mAb/pAb	Monoklonální/polyklonální protilátka (monoclonal/polyclonal antibody)
ML	Metachromatická leukodystrofie
MPS	Mukopolysacharidosa
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
NAGLU	<i>N</i> -acetyl-alfa-glukosaminidasa
NCBI	Národní centrum pro biotechnologické informace
NCL	Neuronální ceroidní lipofuscinosa
NEAA	Neesenciální aminokyselina (non-essential amino acid)
NGS	Sekvenování další generace (next generation sequencing)
NHEJ	Spojování nehomologních konců (non-homologous end joining)
Oct	Transkripční faktor vázající oktamer (octamer-binding transcription factor)
PAM	Protospacer-sousedící motiv (protospacer adjacent motif)
PBMC	Mononukleární buňky z periferní krve (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Fosfátový pufr (phosphate buffer saline)
PCR	Polymerasová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PDGF	Růstový faktor odvozený z destiček (platelet-derived growth factor)
Phe	Fenylalanin (phenylalanine)
PNK	Polynukleotid kinasa
SGSH	<i>N</i> -sulfoglukosamin sulfohydrolasa
Sox	SRY-box (sex determination region Y-box)
SRT	Substrát redukční terapie
ssDNA	Jednovláknová DNA (single-stranded DNA)
SSEA	Fázově specifický embryonální antigen (stage-specific embryonic antigen)
TALEN	Nukleasa založená na efektorech aktivujících transkripci (transcription activator-like effector nuclease)
TFEB	Transkripční faktor EB (transcription factor binding enhancer box)
TGF	Transformační růstový faktor (transforming growth factor)
tracrRNA	Trans-aktivující CRISPR RNA (trans-activating CRISPR RNA)
VTN	Vitronektin
ZFN	Nukleasa zinkového prstu (zinc-finger nuclease)



## Obsah

1	ÚVOD.....	11
1.1	Endosomálně-lysosomální systém.....	11
1.1.1	Lysosom a jeho role v endosomálně-lysosomálním systému.....	11
1.1.2	Transport látek do endosomálně-lysosomálního systému .....	12
1.1.3	Využití produktů lysosomální degradace .....	15
1.1.4	Významnost endosomálně-lysosomálního systému .....	15
1.2	Lysosomální dědičná onemocnění.....	15
1.2.1	Mukopolysacharidosy .....	16
1.3	Diagnostika a léčba lysosomálních dědičných onemocnění.....	21
1.3.1	Diagnostické metody .....	21
1.3.2	Možnosti léčby.....	22
1.4	Metody výzkumu lysosomálních dědičných onemocnění .....	24
1.4.1	Editace genomu systémem CRISPR/Cas9.....	24
1.4.2	Tvorba zvířecích a buněčných modelů systémem CRISPR/Cas9 .....	27
1.4.3	Systém CRISPR/Cas9 a iPSC technologie .....	28
2	CÍLE PRÁCE .....	32
3	MATERIÁL A METODY .....	33
3.1	Materiál.....	33
3.1.1	Biologický materiál a plasmidy .....	33
3.1.2	Chemikálie a roztoky .....	33
3.1.3	Přístroje.....	34
3.1.4	Enzymy a související reagenty.....	35
3.1.5	Protilátky.....	35
3.1.6	Media a roztoky .....	36
3.1.7	Komerční soupravy.....	38
3.2	Příprava plasmidů pro editaci iPSC systémem CRISPR/Cas9 .....	38
3.2.1	Návrh oligonukleotidů .....	38
3.2.2	Příprava vektorů a transformace do buněk .....	38
3.2.3	Izolace a sekvenování plasmidů .....	40
3.3	Příprava buněk pro další experimenty .....	41

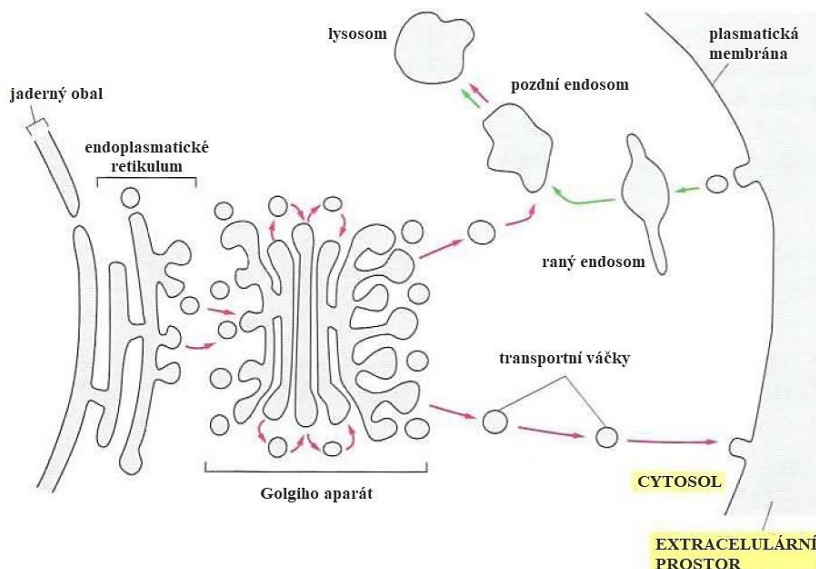
3.3.1	Izolace a ozařování myších embryonálních fibroblastů .....	41
3.3.2	Izolace a reprogramování lidských PBMC .....	42
3.4	Transfekce plasmidů do iPSC .....	43
3.5	Charakterizace iPSC modelů MPS .....	44
3.5.1	Amplifikace, purifikace a sekvenování cílových fragmentů gDNA .....	44
3.5.2	Testování enzymatických aktivit .....	46
3.5.3	Detekce exprese znaků pluripotence .....	49
3.6	Tvorba a charakterizace buněčných modelů MPS odvozených od iPSC .....	50
3.6.1	Chondrogenní diferenciace iPSC .....	50
3.6.2	Imunofluorescence znaku chondrocytů a glykosaminoglykanů .....	51
3.6.3	Fotometrické stanovení glykosaminoglykanů .....	51
4	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	53
4.1	Inaktivace genů <i>GNS</i> , <i>GALNS</i> , <i>GLBI</i> a <i>ARSB</i> systémem CRISPR/Cas9 .....	53
4.2	Charakterizace iPSC modelů MPS .....	57
4.2.1	Sekvenační analýza transfekovaných iPSC .....	57
4.2.2	Testování enzymatických aktivit v geneticky modifikovaných iPSC .....	62
4.2.3	Detekce exprese znaků pluripotence v geneticky modifikovaných iPSC ....	71
4.3	Charakterizace buněčných modelů MPS odvozených od iPSC .....	72
4.3.1	Imunofluorescence kolagenu II, heparan sulfátu a chondroitin sulfátu v buněčných modelech MPS .....	72
4.3.2	Stanovení glykosaminoglykanů v buněčných modelech MPS .....	74
5	ZÁVĚR .....	79
6	SEZNAM ZDROJŮ .....	81

# 1 ÚVOD

## 1.1 Endosomálně-lysosomální systém

Endosomálně-lysosomální systém (ELS) představuje jednu ze základních metabolických regulačních sítí eukaryotických buněk<sup>1</sup>. Jedná se o dynamický několika-stupňový cytoplasmatický kompartment, jehož základem je lysosom a související transportní váčky (tzv. vezikuly)<sup>2</sup>.

Vezikuly zprostředkovávají stálý intracelulární přenos materiálu, a tím zajišťují vzájemnou komunikaci mezi membránovými kompartmenty buňky i mimobuněčným prostorem<sup>3</sup>. Součástí ELS jsou také různé typy endosomů účastnící se transportu látek do lysosomů (Obr. 1.1).



Obr. 1.1 Vezikulární transportní dráhy mezi membránovými kompartmenty buňky a mimobuněčným prostorem<sup>3</sup>.

### 1.1.1 Lysosom a jeho role v endosomálně-lysosomálním systému

Lysosom je organela přítomná ve většině eukaryotických buněk. V buňkách savců kolísá velikost lysosomů mezi 100–1500 nm, zatímco jejich počet připadající na jednu buňku se pohybuje od desítek do stovek. Tyto lysosomální parametry se mění v závislosti na dostupnosti živin<sup>4</sup>.

Lysosomy jsou váčky ohraničené jednoduchou membránou. V lumen lysosomů se nachází hydrolytické enzymy s kyselým pH optimumem ( $\text{pH} \approx 5$ ), které je uvnitř lysosomu udržováno pomocí  $\text{H}^+$ -ATPas a chloridových kanálů v membráně<sup>3,4</sup>.

Membrána lysosomu odděluje obsah lumenu od cytosolu, čímž chrání zbytek buňky před destrukčními účinky lysosomálních enzymů. Při jejich transportu nebo v případě poškození lysosomální membrány zajišťuje bezpečnost rozdílné pH optimum těchto hydrolas a pH cytosolu ( $\text{pH} \approx 7,2$ ). Další funkce lysosomální membrány pramení z jejího unikátního složení<sup>3</sup>. Obsah více než 50 typů membránových proteinů zajišťuje specifický transport látek, ochranu membrány před lysosomálními proteasami i snímání dostupnosti živin ovlivňující velikost, počet a aktivitu lysosomů<sup>4</sup>.

Lysosom, jakožto centrum vnitrobuněčného trávení, se velkou měrou podílí na udržení metabolické homeostasy buňky<sup>1</sup>. Jeho hlavní funkcí je degradace makromolekul (např. proteinů, sacharidů, lipidů, DNA) pocházejících z obnovovaných součástí buňky, poškozených organel aj. intracelulárních i extracelulárních materiálů. Tímto lysosom zajišťuje recyklaci molekulárních prekurzorů a zabraňuje hromadění nepotřebných metabolitů<sup>4,5</sup>.

Specializované hydrolytické enzymy i membránové proteiny lysosomu jsou syntetizovány transkripcí příslušných genů v jádře, translací mRNA transkriptu na ribosomech asociovaných s endoplasmatickým retikulem. Konečnou podobu získávají post-translačními modifikacemi v endoplasmatickém retikulu a Golgiho aparátu, kde jsou mj. označeny specifickou glykosylovou skupinou (např. mannos-6-fosfát), která umožňuje jejich rozpoznávání příslušnými receptory. Následně jsou prostřednictvím transportních váček a pozdních endosomů přeneseny do lysosomu<sup>3</sup>.

Transkripce genů lysosomálních proteinů i mnoha dalších komponentů ELS je regulována především přítomností charakteristických palindromických sekvencí (CLEAR, element koordinované lysosomální exprese a regulace) a hlavním transkripčním faktorem EB (TFEB)<sup>6</sup>.

### *1.1.2 Transport látek do endosomálně-lysosomálního systému*

Materiály, určené k degradaci v lysosomech, jsou dle svého původu dodávány do lysosomů (resp. ELS) třemi různými mechanismy: autofagií, fagocytosou a endocytosou (Obr. 1.2, str. 14).

## **Autofagie**

Autofagie je způsob, kterým jsou do lysosomů dodávány materiály intracelulárního původu. Slouží k odbourávání poškozených nebo starých částí té buňky, ve které se degradace odehrává. Jedná se o neustále probíhající proces, jehož intenzita může růst vlivem stresových podmínek (např. buněčné hladovění)<sup>2</sup>. Dle způsobu transportu substrátu do lysosomu lze autofagii rozdělit na tři typy: mikroautofagie, chaperony zprostředkovaná autofagie (CMA, chaperone-mediated autophagy) a makroautofagie.

Při mikroautofagii dochází k přenosu cytosolického materiálu vchlípením lysosomální membrány za vzniku intralysosomálních vezikul.

Prostřednictvím CMA jsou transportovány rozpustné proteiny, které jsou opatřeny signalizační sekvencí (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) umožňující vazbu cytosolického chaperonu a ten společně s ko-chaperony následně umožní rozbalení a translokaci proteinů přes lysosomální membránu prostřednictvím lysosomálního membránového proteinu typu 2A (LAMP2A, lysosome-associated membrane protein type 2A)<sup>1</sup>.

Makroautofagie je vezikuly zprostředkovaný deformační mechanismus, při němž je cytosolický materiál nejprve selektivně rozpoznán (např. komplexy chaperonů, proteiny teplotního šoku, ubiquitinem), a poté je uzavřen do dvojité membrány za vzniku autofagosomů, které následně splývají s lysosomy<sup>3</sup>. Makroautofagii mohou být v buňce degradovány celé orgány jako např. mitochondrie.

## **Endocytosa**

Endocytosa je proces, při kterém je přenesen extracelulární materiál do buňky obklopením částí buněčné membrány a následným odškrcením za vzniku intracelulárního váčku.

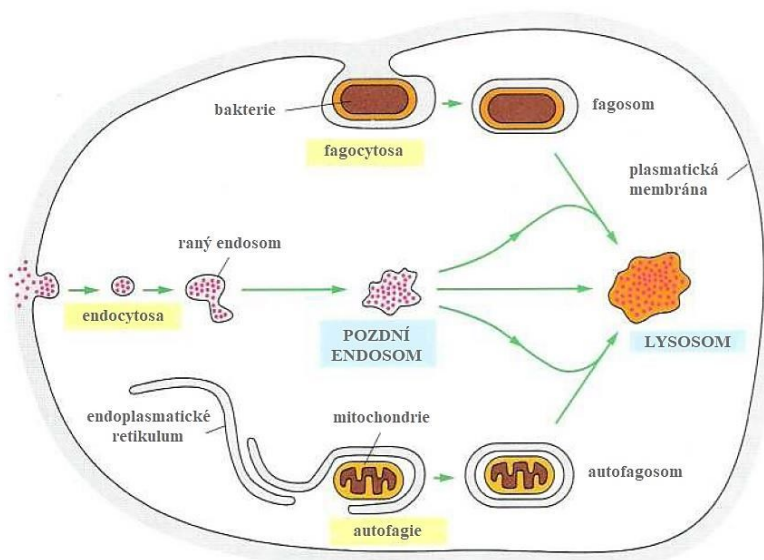
Klathrin-dependentní endocytosa je typem endocytosy zprostředkované receptory a představuje dominantní způsob příjmu extracelulárního materiálu, jehož cílovým určením je lysosom (resp. ELS). Při vazbě ligandu na příslušný receptor v plazmatické membráně dochází k vchlípení části plazmatické membrány, na jejíž cytosolické straně se vytvoří specifický proteinový plášť. Při následném zaškrcení vzniká vnitrobuněčný endocytotický opláštěný váček (pokrytý stovkami molekul klathrinu), který umožňuje další distribuci internalisovaného materiálu ve formě komplexu ligand-receptor<sup>7</sup>.

Na vzniku váčku se podílí celá řada proteinů, nejčastěji se jedná o již zmíněný klathrin (udává tvar váčku), dynamin (odškrcení od buněčné membrány) a adaptin (vazba pláště k membráně váčku a rozpoznávání materiálu určeného k transportu)<sup>3</sup>.

Vzniklé endocytotické váčky ztrácí svůj proteinový plášť a jsou transportovány do časných endosomů, kde vlivem kyselého pH ( $\text{pH} \approx 6,0$ ) dochází k disociaci komplexu ligand-receptor. Receptory jsou recyklovány a pomocí recyklujících endosomů navraceny do plasmatické membrány. Endocytovaný materiál buď postupuje dále v transportních váčkách do pozdních endosomů a následně do lysosomů, jinou možností je postupná přeměna endosomů v lysosomy<sup>2</sup>.

## Fagocytosa

Větší extracelulární částice ( $\geq 0,5 \mu\text{m}$ ) jsou přijímány do buňky fagocytosou. Jedná se o proces podobný endocytose, při němž vznikají intracelulární útvary zvané fagosomy, jejichž membrána je odvozena od buněčné membrány. Interakce fagosomů s pozdními endosomy umožňuje degradaci fagocytované částice v lysosomech<sup>3</sup>.



Obr. 1.2 Dráhy dodávající materiály určené k degradaci do lysosomů<sup>3</sup>.

### 1.1.3 Využití produktů lysosomální degradace

Makromolekuly dopraveny do lysosomů podléhají degradaci prostřednictvím hydrolas přítomných v jeho lumenu. Tímto způsobem jsou substráty štěpeny na základní stavební jednotky i komplexnější sloučeniny<sup>2</sup>. Míra degradace musí být regulována, protože reutilizace komplexnějších metabolitů je často energeticky výhodnější než kompletní *de novo* syntéza<sup>1</sup>.

Produkty lysosomálního katabolismu musí být uvolněny do jiného buněčného kompartmentu nebo vyloučeny z buňky, aby mohly být znovu využity např. v biosyntetických procesech. Na transportu přes lysosomální membránu se podílí řada lysosomálních membránových proteinů, jež zastávají funkci transportérů (např. cystinosin, sialin, transportér cobalaminu)<sup>1</sup>. Nesprávná funkce těchto proteinů má většinou velmi vážné následky z důvodů hromadění metabolitů v lysosomech a jejich nedostatku v cílových biochemických procesech<sup>4</sup>.

### 1.1.4 Významnost endosomálně-lysosomálního systému

Funkce ELS je nezbytná pro zachování buněčné metabolické homeostázy, a tím i pro správnou funkci buňky. Role tohoto vysoce organizovaného a účinného systému je nezastupitelná, a proto jeho selhání vede ke vzniku závažných lysosomálních onemocnění, která mají často fatální následky pro buňky, orgány i jedince<sup>1</sup>.

## 1.2 Lysosomální dědičná onemocnění

Onemocnění spojená s poruchou ELS lze rozdělit do dvou základních kategorií: získaná a geneticky podmíněná. Získané poruchy ELS jsou důsledkem reverzibilního přetížení systému přechodným zvýšením množství substrátu určeného k degradaci v lysosomech. Tato onemocnění, imitující genetické lysosomální poruchy, způsobují látky v extracelulární tekutině aktivující endocytosu intravenosním podáním látek (např. infuze dextranu) nebo v důsledku jiné poruchy (např. hyperlipoproteinemie)<sup>2</sup>.

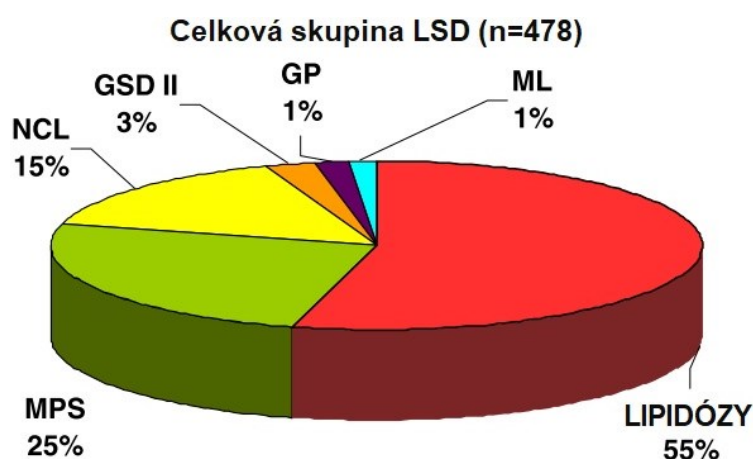
Geneticky podmíněné poruchy ELS, označovány jako lysosomální stádavá onemocnění (LSD, lysosomal storage diseases), jsou způsobovány nedostatečností lysosomálních hydrolas, lysosomálních neenzymatických proteinů, nelysosomálních proteinů nutných pro biogenezy fungujících lysosomů, molekul zajišťujících transport substrátů nebo membránově vázaných proteinů<sup>8</sup>.

V současnosti je známo kolem 60 různých LSD<sup>1</sup>. Společným rysem těchto vzácných dědičných metabolických poruch je většinou nadměrná intralysosomální akumulace makromolekul, které by byly za normálních okolností degradovány v lysosomech, jejíž příčinou jsou mutace příslušných genů vedoucí k nedostatečnosti proteinů nezbytných pro správnou funkci ELS<sup>4</sup>.

Většina dědičných lysosomálních onemocnění je autosomálně recesivní (výjimečně X-vázaná)<sup>9</sup>. Obecně platí, že jsou to progresivní multisystémové choroby, které obvykle vedou k předčasné smrti jedince a nejčastěji postihují děti. Jejich výskyt v naší populaci se odhaduje na 1:8200 živě narozených dětí, čímž se řadí mezi vzácná dědičná onemocnění<sup>10,11</sup>. Liší se od sebe věkem manifestace a klinickým projevem, které závisí na povaze nedegradovaného materiálu i místě akumulace<sup>12</sup>. LSD postihují kosti, svaly, játra, ledviny, ale více než dvě třetiny z nich působí na mozek a CNS<sup>1,13</sup>.

### 1.2.1 Mukopolysacharidosy

Mukopolysacharidosy (MPS) jsou skupinou 11 nemocí, které se řadí mezi lysosomální dědičná stádavá onemocnění. Jedná se o multisystémové poruchy, které se od sebe liší v mnoha faktorech (projevy, závažnost, prevalence). Téměř všechny vykazují autosomálně recesivní dědičnost, kromě MPS typu II, která je vázaná na chromosom X<sup>14</sup>. Z LSD jsou mukopolysacharidosy druhou nejhojněji zastoupenou skupinou nemocí v České populaci (Obr. 1.3)<sup>10</sup>.



Obr. 1.3 Relativní zastoupení lysosomálních stádavých onemocnění v České republice z celkového počtu 478 pacientů<sup>10</sup>. Nejvíce zastoupeny jsou lipidózy a mukopolysacharidosy (MPS), dále neuronální ceroidní lipofuscinosa (NCL), glykogenosa II (GSD II), glykoproteinoso (GP) a metachromatická leukodystrofie (ML).

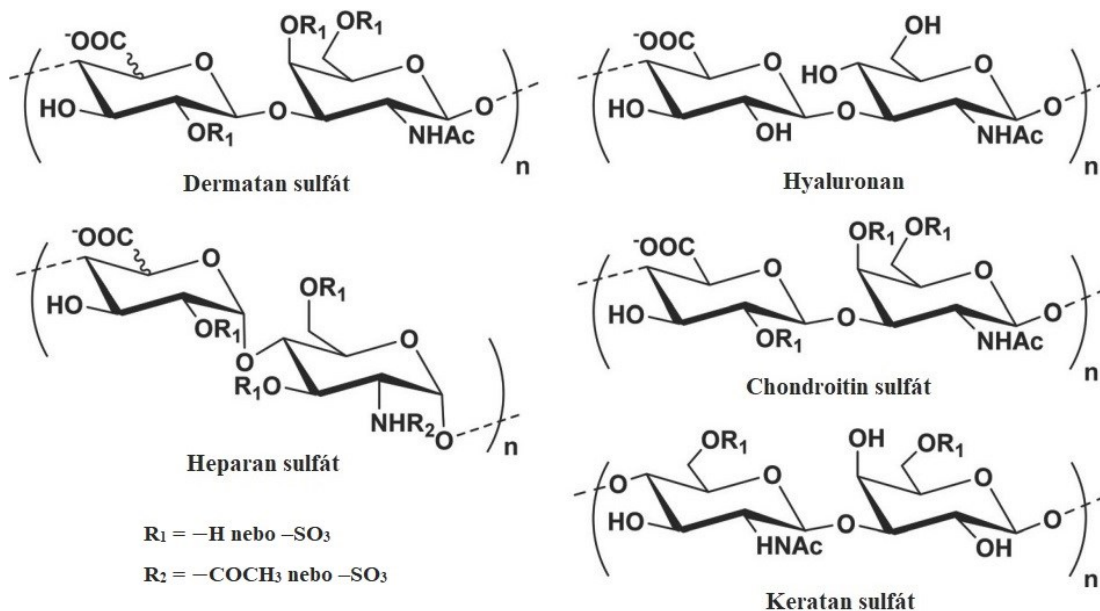


Společnou příčinou všech mukopolysacharidos je mutace určitého genu, která vede k nedostatečnosti odpovídajícího lysosomálního enzymu, jež katalyzuje některý z kroků degradace mukopolysacharidů<sup>14</sup>. Vlivem mutace dochází k nedostatečné degradaci těchto komplexních polysacharidů, což vede k jejich akumulaci v tkáních a orgánech, kde způsobují progresivní poškození<sup>15</sup>.

### Struktura, funkce a degradace glykosaminoglykanů

Mukopolysacharidy neboli glykosaminoglykany (GAG) patří mezi nevětvené heteroglykany, jejichž opakující se jednotkou je disacharid (Obr. 1.4). Tyto monomery jsou obvykle tvořeny hexosaminem (př. *N*-acetylglukosamin) a kyselinou uronovou, resp. jejími deriváty (př. iduronát)<sup>16</sup>. Častý výskyt sulfátových skupin společně s hydroxyly udává kyselý charakter těchto polárních polysacharidů.

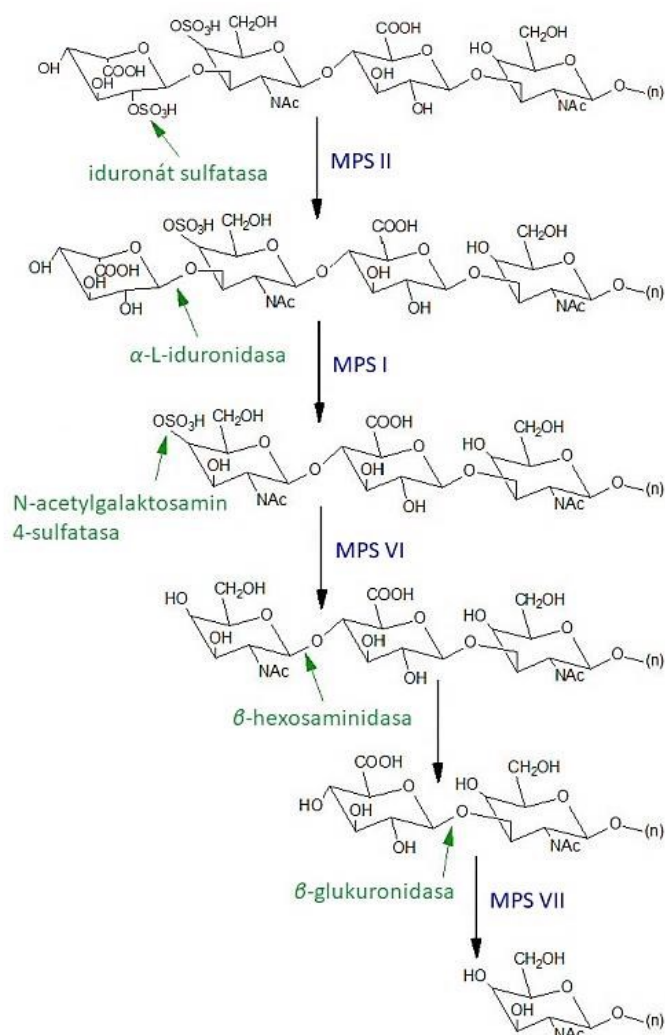
Funkce této heterogenní skupiny látek jsou také velmi různorodé, v extracelulární matrix (ECM) působí nejen jako polyelektrolyty, ale také interakcí s dalšími komponenty ECM zajišťují například adhezi buněk, regulaci buněčného růstu a proliferace, hydrataci tkání, některé vykazují protizánětlivou nebo antikoagulační aktivitu<sup>17</sup>. Mezi tkáně s největším výskytem glykosaminoglykanů patří pojivová tkáň, kůže, rohovka, játra, slezina a vaskulární tkáň<sup>12</sup>.



Obr. 1.4 Struktury disacharidových jednotek glykosaminoglykanů hromadících se v důsledku mukopolysacharidos<sup>18</sup>.

Mezi významné zástupce glykosaminoglykanů a látky hromadící se v důsledku MPS patří dermatan sulfát, heparan sulfát, chondroitin sulfát, keratan sulfát a kyselina hylauronová (hyaluronan)<sup>12,19</sup>. Obvykle se vyskytují ve formě proteoglykanů, tedy vázané na proteiny.

Glykosaminoglykany produkty lysosomální degradace proteoglykanů, které obvykle pochází z buněčného povrchu nebo extracelulární matrix. Volné glykosaminoglykany podléhají postupné enzymatické degradaci obvykle od neredukujícího konce. Degradčních drah pět výše uvedených zástupců se účastní tři skupiny enzymů, patří mezi ně glykosidasy, sulfatasy a nehydrolytická transferasa<sup>15</sup>.



Obr. 1.5 Postupná enzymatická degradace dermatan sulfátu zobrazující enzymy katalyzující degradační reakce (zelená) a nemoci způsobené deficiencí příslušných enzymů (modrá)<sup>20</sup>.

K enzymatické degradaci dermatan sulfátu (Obr. 1.5) dochází postupným působením tří glykosidas ( $\alpha$ -L-iduronidasa,  $\beta$ -glukuronidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa) a dvou sulfatas (iduronát-2-sulfatasa, *N*-acetylgalaktosamin-4-sulfatasa)<sup>20</sup>. Degradční dráha chondroitin sulfátu zahrnuje dvě glykosidasy ( $\beta$ -glukuronidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa) a dvě sulfatasy (*N*-acetylgalaktosamin-6-sulfatasa, arylsulfatasa B). Heparan sulfát je degradován působením tří glykosidas ( $\alpha$ -L-iduronidasa,  $\alpha$ -*N*-acetylglukosaminidasa,  $\beta$ -glukuronidasa), čtyř sulfatas (iduronát-2-sulfatasa, glukuronát-2-sulfatasa, heparan-*N*-sulfatasa, *N*-acetylglukosamin-6-sulfatasa) a acetyltransferasy (heparan- $\alpha$ -glukosaminid-*N*-acetyltransferasa). Při degradaci hyaluronanu hraje zásadní roli hyaluronidasa. Na degradaci keratan sulfátu se podílí tři glykosidasy ( $\beta$ -galaktosidasa,  $\beta$ -hexosaminidasa) a dvě sulfatasy (*N*-acetylgalaktosamin-6-sulfatasa, *N*-acetylglukosamin-6-sulfatasa)<sup>20</sup>.

### Klasifikace mukopolysacharidos

Podle projevů a poškození genu, které je příčinou onemocnění lze rozlišit jednotlivé typy mukopolysacharidos (Tab. 1.1).

*Tab. 1.1 Typy mukopolysacharidos, s nimi související geny, enzymy a kumulující se glykosaminoglykany (GAG), dermatan sulfát (DS), heparan sulfát (HS), hyaluronan (HA), chondroitin sulfát (CS) a keratan sulfát (KS)<sup>12,21</sup>.*

Onemocnění	Gen	Deficitní enzym	GAG
MPS I	<i>IDUA</i>	$\alpha$ -L-iduronidasa	DS, HS
MPS II	<i>IDS</i>	iduronát-2-sulfatasa	DS, HS
MPS IIIA	<i>SGSH</i>	<i>N</i> -sulfo-glukosamin sulfohydrolasa	HS
MPS IIIB	<i>NAGLU</i>	$\alpha$ - <i>N</i> -acetylglukosaminidasa	HS
MPS IIIC	<i>HGSNAT</i>	heparan- $\alpha$ -glukosaminid <i>N</i> -acetyltransferasa	HS
MPS IIID	<i>GNS</i>	<i>N</i> -acetylglukosamin-6-sulfát sulfatasa	HS
MPS IVA	<i>GALNS</i>	<i>N</i> -acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasa	KS, CS
MPS IVB	<i>GLB1</i>	$\beta$ -galaktosidasa	KS
MPS VI	<i>ARSB</i>	arylsulfatasa B	DS
MPS VII	<i>GUSB</i>	$\beta$ -glukuronidasa	DS, HS, CS
MPS IX	<i>HYAL1</i>	hyaluronidasa	HA

Z klinického hlediska lze mukopolysacharidosy také rozdělit do tří skupin dle převládajícího fenotypu: viscerální, neurodegenerativní a kosterní.

Viscerální poruchy dominují u MPS typu I, II, VI a VII. Společné příznaky těchto nemocí se obvykle projeví do předškolního věku a patří mezi ně obstrukce dýchacích cest, hepatosplenomegalie, srdeční poruchy, ale i nezvyklé rysy v obličeji, dysplasie kostí a další skeletální abnormality<sup>12,14</sup>.

MPS typu I a MPS typu II (Hunterův syndrom) jsou ze všech MPS nejběžnější, dochází při nich k akumulaci heparan sulfátu a keratan sulfátu v tkáních. Oproti společným příznakům MPS viscerálního typu se projevují také opožděným vývojem a ztrátou sluchu. V závažnějších případech postupně dochází k mentální a intelektuální degeneraci<sup>14</sup>. Zákal rohovky je typickým projevem MPS typu I, která se dále rozděluje dle klinických projevů a závažnosti na syndrom Hurlerové, syndrom Hurlerové-Scheiův a Scheiův syndrom<sup>22</sup>.

V případě MPS typu VI (Maroteauxův-Lamyův syndrom) je narušena pouze degradace dermatan sulfátu, který má v CNS minoritní zastoupení, proto mezi její projevy nepatří mentální poruchy a vliv na intelekt jedince<sup>12</sup>.

U MPS typu VII, známé také pod názvem Slyův syndrom, dochází v tkáních k hromadění heparan sulfátu, chondroitin sulfátu i dermatan sulfátu. Nejčastějším projevem závažné formy je neimunní hydrops plodu, který často vede ke smrti jedince již v prenatálním nebo neonatálním období. Přeživší trpí obvykle mentální retardací<sup>23</sup>.

V případě MPS typu III u pacientů dochází především k neurodegenerativním změnám. Tento typ MPS, označovaný jako Sanfilippův syndrom, je specifický významnými neuropsychiatrickými a lehkými somatickými problémy, které vznikají v důsledku chybného metabolismu heparan sulfátu, který se hromadí především v mozku<sup>12</sup>. Mezi první projevy tohoto onemocnění patří opožděný intelektuální vývoj, agrese, hyperaktivita, úzkost, poruchy spánku apod<sup>14,24</sup>. V některých případech se vývoj dítěte zastaví už mezi 36.–40. týdnem, při méně závažné formě nemoci až mezi 5.–10. rokem<sup>24,25</sup>. U pacientů postupně dochází k encefalopatii doprovázené ztrátou řeči, křečemi svalstva a záchvaty. Ke smrti jedince obvykle dochází v období puberty<sup>24</sup>.

Do skupiny MPS s dominujícím postižením skeletu patří MPS typu IV neboli Morquioův syndrom. Nejčastějším projevem tohoto onemocnění je skeletální dysplazie, ke které dochází v důsledku hromadění keratan sulfátu a chondroitin sulfátu v kostech

a chrupavkách<sup>26</sup>. Mezi další příznaky, které se projevují již v prvních letech života, patří zkrácené končetiny, malý vzrůst, valgozita kolenních kloubů, skolióza, deformace kostí apod<sup>14,27</sup>. V závažnějších případech se objevují i neskeletální problémy, jako například ztráta sluchu, nemoci plic a srdce<sup>12</sup>.

MPS typu IX (Natowiczův syndrom) je nejvzácnější ze všech MPS. Jedná se o onemocnění způsobené nedostatečností hyaluronidasy 1 degradující hyaluronát. Nelze ji zařadit do žádné z uvedených skupin MPS, protože dosud je známo pouze pár pacientů s různými příznaky jako otoky kloubů, tkáňové shluky, artritida, skeletální abnormality, malý vzrůst, poruchy viscerálních orgánů, atd<sup>28,29</sup>.

### **1.3 Diagnostika a léčba lysosomálních dědičných onemocnění**

#### *1.3.1 Diagnostické metody*

V současnosti neexistuje univerzální test pro všechny typy lysosomálních stádavých onemocnění. Laboratorní diagnostika LSD se provádí po rozpoznání klinických příznaků charakteristických pro danou nemoc nebo preventivně na základě rodinné anamnézy<sup>30</sup>.

Do první fáze laboratorní diagnostiky patří tzv. předběžné screeningové testy, které jsou založeny na detekci nebo stanovení látek akumulovaných v důsledku deficitu lysosomálních enzymů či proteinů ve vzorcích krve a moči<sup>31</sup>. Tyto testy umožňují objasnit, zda se opravdu jedná o LSD, případně o jaký typ (např. glykosaminoglykany v moči značí mukopolysacharidosy). Pro tyto účely se nejčastěji používají metody jako chromatografie na tenké vrstvě, elektroforéza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie<sup>14,31</sup>.

Po předběžných screeningových testech následuje, pro přesné určení diagnózy, testování specifické enzymatické aktivity konkrétních lysosomálních hydrolas v leukocytech či lymfocytech izolovaných z krve, fibroblastech, amniocytech nebo choriových klků<sup>32</sup>. Enzymatická aktivita se nejčastěji testuje pomocí fluorimetrických metod, jejímž principem je štěpení specifického syntetického substrátu příslušným enzymem ze vzorku, při kterém dochází k uvolnění fluoroforu (nejčastěji 4-methylumbelliferonu) doprovázené vzrůstem fluorescence, která je detekována<sup>9,31</sup>. Další možností je testování enzymatické aktivity metodami tandemové hmotnostní spektrometrie<sup>9</sup>.

Existují speciální případy, které vyžadují specifický přístup při diagnostice, jedná se zejména o pseudodeficienci enzymů způsobené polymorfismem, defekty v transportních procesech lysosomálních enzymů a neenzymatických lysosomálních proteinů<sup>31</sup>.

Do další fáze laboratorní diagnostiky LSD patří molekulárně-genetické metody, které slouží pro definitivní potvrzení výsledků testů enzymatické aktivity, vyloučení pseudodeficiency enzymu, stanovení konečné diagnózy LSD bez možnosti biochemického testování<sup>33</sup>. Navíc určení genotypu pomáhá předpovědět fenotyp popřípadě zvolit vhodný způsob léčby<sup>14</sup>. Jedná se především o genetické testování za účelem nalezení patogenní mutace, která je pro jednotlivé formy LSD charakteristická<sup>31</sup>. Genomová DNA je izolována z krve případně jiného dostupného materiálu, a po amplifikaci specifických genových segmentů, je podrobena analýze Sangerovým sekvenováním případně sekvenováním nové generace (NGS, next generation sequencing)<sup>9</sup>. Vzhledem k poklesu ceny se dnes NGS prosazuje i jako metoda první volby, protože umožňuje najednou sekvenovat celý panel vybraných genů, případně celý exom či genom.

Laboratorní diagnostika LSD se také využívá pro identifikaci ohrožených členů rodiny a heterozygotů (potencionálních přenašečů) nebo prenatální diagnostiku<sup>31</sup>.

### *1.3.2 Možnosti léčby*

Existují tři principiálně odlišné strategie léčby LSD.

Nejstarší přístup k léčbě LSD je založen na paliativní a podpůrné péči, která se zaměřuje na léčbu projevů nemoci a zmírnění jejich následků. Do konce 80. let se jednalo o jediný způsob terapie tohoto typu onemocnění<sup>34</sup>. Dodnes se však používá, pokud jiné možnosti terapie nejsou dostupné, jako doprovodný způsob léčby nebo v pokročilém stádiu nemoci. Tento přístup vyžaduje pravidelné návštěvy specialistů a zahrnuje nejčastěji chirurgické zákroky, fyzioterapie, nošení ortéz, speciálních brýlí, naslouchátek apod<sup>35</sup>.

Pokročilejší léčebné strategie vycházejí z podstaty většiny LSD, deficitu lysosomálních hydrolas, a zaměřují se na zvýšení zbytkové aktivity těchto enzymů, jeho nahrazení nebo obnovení. Mezi nejvýznamnější z nich patří enzymová substituční

terapie a genová terapie, ale také terapie chaperony, transplantace kostní dřeně nebo hematopoetických kmenových buněk<sup>35</sup>.

Enzymová substituční terapie (ERT, enzyme replacement therapy) spočívá v pravidelném intravenosním podávání aktivního rekombinantního enzymu nahrazujícího defektní enzym, který je z krevního oběhu transprotován do lysosomů v tkáních<sup>35,36</sup>. Tento způsob léčby efektivně snižuje množství akumulovaného materiálu a zlepšuje funkci postižených orgánů. Limitací ERT je problém transportu enzymu do mozku (neprocházejí hematoencefalickou bariérou), kostí nebo chrupavek<sup>35</sup>. Mezi další nevýhody této terapie patří cenová náročnost a snižování terapeutického účinku produkcí protilátek proti rekombinantnímu enzymu<sup>34</sup>.

Za nejefektivnější léčbu monogenetických chorob jako jsou LSD je považována genová terapie. Tento přístup je založen na zvýšení aktivity deficitního enzymu vpravením normální kopie postiženého genu, která zajistí syntézu normálního proteinu<sup>34</sup>. Jsou rozlišovány dvě možnosti genové terapie: *ex vivo* a *in vivo*.

Při *in vivo* genové terapii je vpraven vektor nesoucí komplementární DNA kódující příslušný enzym přímo do tkání. V lokálních buňkách dochází k expresi genu a tvorbě potřebného enzymu, následně může docházet k jeho sekreci a zachytu dalšími cílovými buňkami<sup>35</sup>.

Další možností genové terapie je *ex vivo* modifikace buněk a jejich transplantace. Nejčastěji se využívají hematopoetické progenitorské buňky, které v cílové tkáni diferencují, navíc mají schopnost procházet hematoencefalickou bariérou a umožňují tak léčbu i neurologických LSD<sup>35</sup>. Pro účely této genové terapie se v dnešní době využívají především adeno-asociované viry<sup>34</sup>.

Oproti ERT má genová terapie řadu výhod, umožňuje dlouhodobou expresi příslušného enzymu i léčbu CNS, díky možnosti vpravení vektoru do mozku. Nicméně, léčba LSD užitím genové terapie je zatím pouze ve fázi testování na zvířecích modelech nebo klinických studiích<sup>35</sup>.

Alternativním přístupem výše uvedených metod je terapie redukcí substrátu (SRT, substrate reduction therapy), která se zaměřuje na redukcí množství hromadícího se materiálu prostřednictvím látek blokujících jeho syntézu (př. genistein inhibuje syntézu glykosaminoglykanů)<sup>36</sup>. Výhodou aplikací inhibitorů je, že nevyvolávají imunitní reakci, mohou procházet hematoencefalickou bariérou a je možné je podávat orálně.

Nicméně, tento způsob léčby je dostupný jen pro několik LSD a v řadě případů pouze zmírňuje klinické projevy nemoci.

## 1.4 Metody výzkumu lysosomálních dědičných onemocnění

V minulosti, byly popsány klinické projevy a molekulární podstaty LSD sledováním postižených pacientů a studiem jejich biologického materiálu. Množství takového materiálu je však omezené a často nezahrnuje relevantní buněčné typy, protože odběr nemocí postihovaných tkání je invazivní a pro výzkumné účely z etických důvodů nemožný.

Pro studium patogeneze vzácných LSD a nových terapeutických přístupů je biologický materiál pacientů nedostupný, a proto se v současnosti pro tyto účely využívají převážně geneticky modifikované buněčné a zvířecí modely.

### 1.4.1 Editace genomu systémem CRISPR/Cas9

V posledních letech bylo publikováno množství technologií pro cílené modifikace (editace) genomu. Tyto techniky nejčastěji využívají sekvenčně specifické endonukleasy, které zprostředkovávají změny genomu s vysokou přesností<sup>37</sup>. Jednou z nejpoužívanějších je nukleasa Cas9 resp. systém CRISPR/Cas9, který představuje jednoduchý a účinný nástroj pro editaci genomu.

Nahromaděné pravidelně rozmístěné krátké palindromické repetice (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats) jsou úseky v genomové DNA prokaryot, které obsahují krátké repetice 21–48 nukleotidů<sup>38</sup>. Tyto úseky rozdělují různé nerepetitivní sekvence označované jako spacers. Jedná se o krátké DNA fragmenty inkorporované do hostitelského genomu prokaryot, které vznikají štěpením protospaceru (DNA pocházející z viru nebo plasmidu) působením Cas (CRISPR-associated) nukleasy. Sekvence spacerů jsou unikátní a závisí na DNA rozpoznávaného viru nebo plasmidu.

Systém CRISPR/Cas je přirozený adaptivní imunitní systém bakterií a archeí, který využívají k obraně proti virům<sup>39</sup>. Při následné virové infekci slouží spacer jako templát pro tvorbu crRNA (CRISPR RNA), která se váže na tracrRNA (trans-activating crRNA). Vzniklý komplex tracrRNA:crRNA navádí Cas nukleasu štěpící cílovou DNA sekvenci, tím umožňuje najít a zničit DNA podobných virů při následných infekcích.



Dosud bylo publikováno přes 40 různých rodin proteinů Cas, které hrají důležitou roli při syntéze crRNA, inkorporaci spacerů a štěpení invazní DNA<sup>40</sup>. Podle sekvence a struktury Cas proteinu lze rozlišit tři typy systémů CRISPR/Cas<sup>41</sup>. Systém typu II je CRISPR/Cas9 obsahující Cas protein 9 (Cas9), který má dvě nukleasové domény štěpící obě vlákna invazní DNA v místě komplementárním k crRNA<sup>42</sup>.

Editace genomu prostřednictvím systému CRISPR/Cas9 vyžaduje přítomnost nespecifické Cas9 nukleasy a naváděcí RNA (gRNA, guide RNA), které společně umožňují štěpení DNA a tvorbu dvouřetězcových zlomů v cílovém místě editované DNA<sup>39</sup>, což způsobí aktivaci endogenních opravných mechanismů (Obr. 1.6).

Specifita systému CRISPR/Cas9 závisí na sekvenci gRNA, která zastupuje funkci komplexu tracrRNA:crRNA a přítomnosti protospacer-sousedícího motivu (PAM, protospacer adjacent motif) za cílovou sekvencí editované DNA<sup>39</sup>. Jedná se o krátkou sekvenci tvořenou 2–6 páry bází, která umožňuje štěpení Cas nukleasou. Různé Cas nukleasy specificky rozpoznávají různé PAM sekvence.

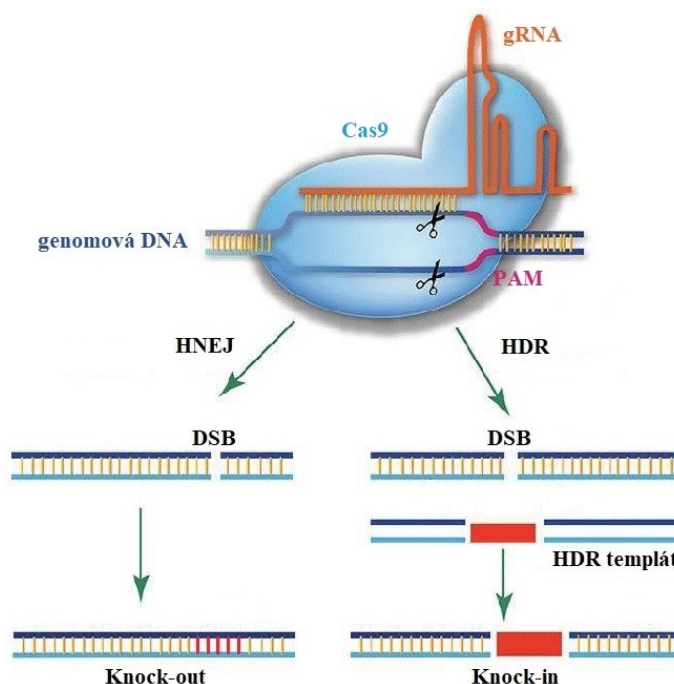
V genovém inženýrství se nejčastěji pro tyto účely využívá Cas9 pocházející z bakterie *Streptococcus pyogenes*, která je také označována jako SpCas9. Tato nukleasa rozpoznává PAM sekvenci 5'-NGG-3' a štěpí DNA 3–4 nukleotidy před ní za vzniku dvouřetězcových zlomů<sup>43</sup>.

Systém CRISPR/Cas9 obvykle rozpoznává specifickou sekvenci 22–29 nukleotidů, která je pro většinu genomů jedinečná. Nicméně, může docházet k nespecifickému štěpení vlivem nesprávného párování gRNA s cílovou sekvencí DNA, v případě SpCas9 se může jednat o nesoulad až šesti párů bází<sup>42</sup>.

Poškození editované DNA systémem CRISPR/Cas9 aktivuje endogenní opravné systémy. Vzniklý dvouřetězcový zlom může být opraven dvěma různými mechanismy. Oprava spojováním nehomologních konců (NHEJ, non-homologous end joining) vede k rychlé ligaci konců dvouřetězcového zlomu, přičemž obvykle dochází k mutaci ve formě malé inserce či delece<sup>39</sup>. Tento opravný proces může být využit pro narušení nebo zrušení funkce cílového genu neboli tzv. *knock-out* genu, pokud vlivem mutací dojde k posunu čtecího rámce nebo vzniku stop kodonu v oblasti exonu<sup>37</sup>.

Druhým opravným mechanismem je homologii řízená oprava (HDR, homology-directed repair)<sup>37</sup>. Jedná se o méně častý a složitější mechanismus vyžadující přítomnost donoru sekvence DNA, která slouží jako templát opravy. Pokud je opravný

templát identický s původní sekvencí DNA v oblasti dvouřetězcového zlomu dochází k opravě DNA bez vzniku mutace. Tento mechanismus může být využit pro přesnou definovanou modifikaci DNA v cílovém místě, pokud je dodána opravná šablona ve formě dsDNA nebo ssDNA obsahující homologní ramena a insertovanou sekvenci. Tímto způsobem dochází k inserci nebo konverzi požadované sekvence v cílovém místě (tzv. *knock-in* genu), což může vést ke změně funkce nebo opravě mutovaného genu.



Obr. 1.6 Editace genomu systémem CRISPR/Cas9<sup>44</sup>. Naváděcí RNA (oranžová) hybridizuje s cílovou sekvencí DNA (modrá). Přítomnost PAM (růžová) umožňuje štěpení Cas9 nukleasou (světle modrá) za vzniku dvouřetězcového zlomu (DSB). Endogenní mechanismy NHEJ nebo HDR katalyzují opravu DNA.

V porovnání s ostatními technikami editace genomu využívající endonukleasy, jako jsou ZFN (zinc-finger nuklease) nebo TALEN (transcription activator-like effector nuclease), má systém CRISPR/Cas9 řadu výhod<sup>37</sup>. Patří mezi ně jednodušší a levnější příprava nebo vyšší specifita modifikace DNA. Další nespornou výhodou je možnost editace genomu na více místech současně s použitím několika různých gRNA<sup>45</sup>.

Použití systému CRISPR/Cas9 v genovém inženýrství má i řadu omezení. Hlavní nevýhodou je tvorba mutací mimo cílové místo, ke kterým dochází v důsledku štěpení stejných nebo podobných DNA sekvencí místo cílové DNA sekvence<sup>39</sup>. V současnosti se využívají různé techniky minimalizující vznik nespecifických mutací<sup>37,45</sup>.

Mezi další limity této metody patří možnosti aplikace systému CRISPR/Cas9 do organismu, závislost na přítomnosti PAM sekvence a tvorba gRNA<sup>39</sup>.

Editaci genomu systémem CRISPR/Cas9 lze využít pro modelování různých nemocí, mezi které patří i zmíněné LSD. Systém CRISPR/Cas9 společně s mechanismem NHEJ vytvoří mutaci v cílovém místě vedoucí ke ztrátě funkce genu, který je danou nemocí postihován. Aplikací tohoto systému lze připravit *knock-out* zvířecí i buněčné modely LSD, které je možné dále studovat.

Další možností využití systému CRISPR/Cas9 je jeho spojení s mechanismem HDR, kdy v přítomnosti templátu se správnou DNA sekvencí může dojít k opravě mutovaného genu. Terapeutický potenciál této metody byl zatím testován pouze na zvířecích modelech a je ve fázi výzkumu.

#### 1.4.2 Tvorba zvířecích a buněčných modelů systémem CRISPR/Cas9

Vývoj systému CRISPR/Cas9 jako účinného nástroje pro editaci genomu společně s vývojem různých doručovacích metod umožnil rychlejší produkci zvířecích a buněčných modelů lidských nemocí.

Komponenty systému CRISPR/Cas9 je nutné dopravit do jádra buněk a to ve formě DNA, RNA nebo proteinů<sup>46</sup>. Metody usnadňující prostup těchto makromolekul přes membrány umožňují tvorbu zvířecích modelů *ex vivo* nebo *in vivo*<sup>46,47</sup>, případně buněčných modelů *in vitro*<sup>48</sup>.

#### **Zvířecí modely lysosomálních dědičných onemocnění**

Pro většinu vzácných LSD nebyl dosud nalezen účinný způsob léčby, proto se zvířecí modely těchto nemocí využívají především pro studium účinnosti nových terapeutických přístupů.

Nejčastěji se jedná o *knock-out* modely myší, krys a dáníí pruhovaných<sup>49</sup>. Mezi hlavní výhody těchto zvířecích modelů patří krátký životní cyklus, krátká doba březosti a nízké nároky na chov<sup>50</sup>. Avšak, jejich krátký životní cyklus neumožňuje dlouhodobé studie a malý vzrůst znamená omezené množství vzorku tkání a tělních tekutin. Další velkou nevýhodou jsou mezidruhové rozdíly v patogenezi nemocí nebo rozdílné katabolické dráhy hromadících se substrátů.

Vyšší podobnost patogeneze řady nemocí vykazují modely větších zvířat (kočky, prasata, králíci, opice, psi). Tvorba takových modelů připravených systém CRISPR/Cas9 je však časově i finančně náročná. V případě LSD, byl dosud publikován pouze ovčí model neuronální ceroidní lipofuscinosis<sup>51</sup>.

### **Buněčné modely lysosomálních dědičných onemocnění**

Limity zvířecích modelů vedly k vývoji lidských buněčných modelů, které se uplatňují především pro objasnění vývoje, patologie a mechanismu lidských nemocí. Nevýhodou buněčných modelů je, že zobrazení pouze vliv onemocnění na vybraný buněčný typ, nikoliv na organismus. V této oblasti našly uplatnění především lidské embryonální kmenové buňky (ESC, embryonic stem cells) a lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC, induced pluripotent stem cells).

Technologie iPSC umožňuje mj. modelování vzácných monogenních nemocí, proto je hojně využívána i pro tvorbu buněčných modelů lysosomálních dědičných onemocnění. Dosud byly publikovány iPSC modely asi třetiny LSD, které významně přispěly k objasnění jejich mechanismů a testování různých léčebných metod. Pro studium těchto vzácných nemocí je iPSC technologie důležitá především kvůli obtížné dostupnosti materiálu, která je dána nízkou prevalencí v populaci a typem tkání, které tyto nemoci postihují nejčastěji (neurony, kardiomyocyty, hematopoetické buňky)<sup>52</sup>.

#### *1.4.3 Systém CRISPR/Cas9 a iPSC technologie*

### **Pluripotentní kmenové buňky**

Pluripotentní kmenové buňky jsou skupinou buněk, které mají téměř neomezený diferenciální potenciál a mohou tvořit tkáně všech tří zárodečných listů (endoderm, mezoderm, ektoderm). Oproti totipotentním buňkám nedokážou tvořit extraembryonální tkáně. U člověka se přirozeně pluripotentní buňky vyskytují ve formě embryonálních kmenových buněk, které se získávají z vnitřní části blastocysty v raném stádiu vývoje embrya. Pro využití těchto buněk je nutná jejich izolace a kultivace za podmínek umožňující zachování sebeobnovy a diferenciálního potenciálu<sup>53</sup>. Ačkoliv by mohli být ESC užitečné v mnoha oblastech výzkumu, má jejich využití řadu omezení, především kvůli nutnosti destrukce lidského embrya při jejich izolaci a nemožnosti získat ESC od pacientů se studovanými genetickými poruchami.

Alternativou ESC jsou indukované pluripotentní kmenové buňky, které vznikají reprogramováním specializovaných somatických buněk. Společnými znaky ESC a iPSC je morfologie, pluripotence, genová exprese, proliferace, schopnost sebeobnovy a diferenciace do tří zárodečných listů<sup>54</sup>. Tyto vlastnosti slouží pro potvrzení kvality vytvořených iPSC. Nejběžnější využívanou metodou je imunofluorescenční detekce znaků pluripotence (Nanog, SSEA-4, LIN-28, Sox-2 atd.) nebo schopnost diferenciace do tří zárodečných listů.

První iPSC byly vytvořeny s použitím retrovirů nebo lentivirů nesoucí geny transkripčních reprogramovacích faktorů<sup>54-56</sup>. Tyto metody jsou založené na virové transdukcii, a proto mají řadu omezení a rizik. Postupem času byly vyvinuty techniky, při kterých nedochází k trvalé integraci virových genů do hostitelské DNA. Tyto alternativní přístupy využívají pro expresi reprogramovacích faktorů například adenovirové vektory, plasmidy, epizomální vektory nebo vektory založené na Sendai viru<sup>57</sup>. Další možností je reprogramování bez použití DNA zprostředkované rekombinantními proteiny, případně modifikovanými mRNA<sup>58</sup>. Účinnost, cena a riziko integrace do hostitelského genomu jsou hlavními kritérii pro výběr metody.

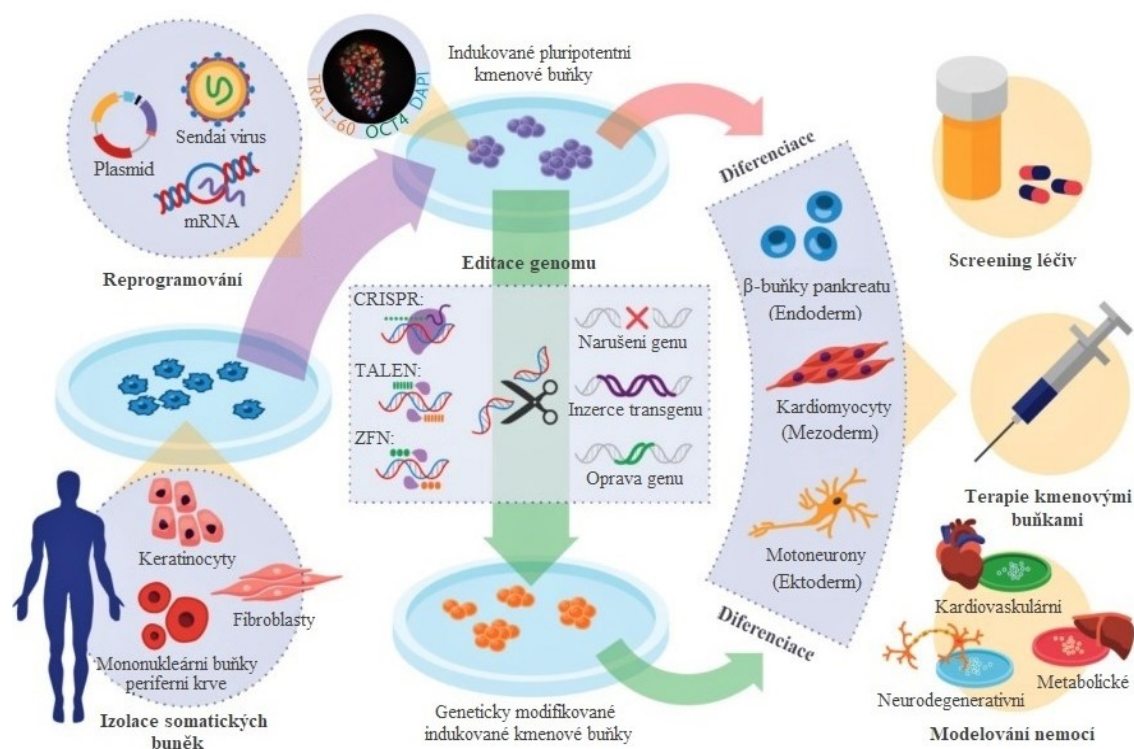
Zdrojem pro reprogramování mohou být teoreticky všechny mononukleární somatické buňky. V praxi se nejčastěji využívají fibroblasty, lymfocyty nebo buňky kultivované z moči.

### ***In vitro* modelování nemocí a diferenciace iPSC**

Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky jsou často využívány pro tvorbu buněčných modelů lidských nemocí. V mnoha ohledech zastupují zvířecí buněčné modely, které se často fenotypově odlišují. Vlastnosti iPSC, především možnost diferenciace a schopnost sebeobnovy, umožňují využití těchto buněčných modelů pro studium patogeneze nemocí, screening léčiv nebo jiných léčebných metod. Navíc, reprogramováním somatických buněk vznikají iPSC specifické pro daného pacienta a nemoc, což je výhodou oproti ESC, u kterých je tato vlastnost obtížně dosažitelná<sup>59</sup>.

Schopnost sebeobnovy iPSC zajišťuje tvorbu teoreticky neomezeného množství materiálu, proto tato technologie našla využití například v modelování vzácných genetických chorob. Díky možnosti diferenciace mohou být studovány relevantní buněčné typy různých druhů nemocí (např. neurodegenerativní, metabolické).

Monogenní nemoci lze modelovat prostřednictvím iPSC dvěma způsoby (Obr. 1.7). V obou případech dochází k izolaci snadno dostupných somatických buněk, které jsou následně reprogramovány na iPSC transdukcí reprogramovacích faktorů. Buňky pocházející od pacienta trpícího modelovanou nemocí jsou následně diferencovány do nemocí postihovaných buněk a dále využívány. Pocházejí-li buňky od zdravého jedince, dochází po reprogramování k editaci jejich genomu (*knock-out* genu, inserce transgenu), která vede ke ztrátě funkce genu specifického pro danou nemoc. Geneticky upravené iPSC mohou být diferencovány a studovány stejně jako buňky pacientů.



Obr. 1.7 Schéma shrnující tvorbu, diferenciaci a nejčastější využití iPSC<sup>60</sup>. Izolované somatické buňky jsou reprogramovány na iPSC, které mohou být geneticky modifikovány nebo přímo diferencovány do cílových buněčných typů a následně využity pro modelování nemocí, screening léčiv nebo terapii kmenovými buňkami.

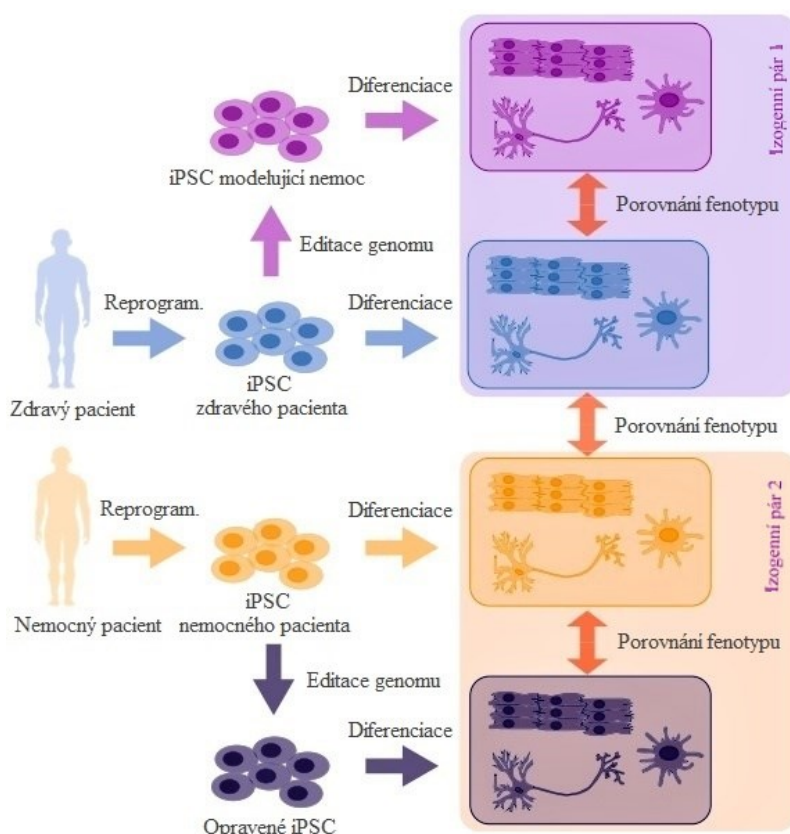
Diferenciace je proces, při kterém dochází k přeměně iPSC na specializované somatické buňky. V posledních letech bylo publikováno velké množství protokolů umožňujících řízenou *in vitro* diferenciaci do různých typů tkání (např. adipocyty, hepatocyty, chondrocyty, kardiomyocyty, nervové buňky, osteocyty, buňky pankreatu, kosterního a hladkého svalstva)<sup>61,62</sup>, především dle dostupnosti biologického materiálu

a frekvence výskytu onemocnění v populaci. Při tomto procesu hrají hlavní roli transkripční faktory, které regulují genovou expresi a tím udávají cestu diferenciaci.

Studium iPSC modelů lidských nemocí je založeno na porovnávání fenotypů diferencovaných buněk (Obr. 1.8)<sup>63</sup>. Buňky nemocného pacienta jsou porovnávány s buňkami zdravého jedince nebo je studium modelů založeno na tvorbě geneticky shodných izogenních párů.

Editace genomu iPSC umožňuje vložení specifické mutace do zdravé kontrolní linie, tyto modifikované iPSC jsou společně s kontrolními buňkami diferencovány do cílových buněčných typů a vzájemně porovnávány. Druhou možností je oprava mutace genu nemocných buněk, které jsou porovnávány s buňkami nemocného pacienta.

Účinným nástrojem pro editaci genomu iPSC je systém CRIPR/Cas9, který bývá nejčastěji dopraven do buněk transfekcí plasmidu (kodujícího Cas9 a gRNA) prostřednictvím elektroporace, mikroinjekce, lipofekce atd<sup>48</sup>.



Obr. 1.8 Možnosti studia buněčných modelů nemocí odvozených od iPSC<sup>63</sup>. Izogenní páry jsou tvořeny diferencovanými modifikovanými (fialová) a původními iPSC zdravého jedince (modrá), resp. modifikovanými (tmavě modrá) iPSC nemocného pacienta (žlutá). Získané buněčné linie jsou vzájemně porovnávány.

## 2 CÍLE PRÁCE

Lidské buněčné modely lysosomálních dědičných onemocnění zastupují v mnoha ohledech biologický materiál pacientů, jehož množství je omezené a často nezahrnuje relevantní buněčné typy, ale také zvířecí modely, které mají řadu omezení mj. kvůli mezidruhovým rozdílům.

Hlavním cílem této diplomové práce je příprava iPSC modelů vybraných typů mukopolysacharidos (MPS IIID, MPSIVA, MPSIVB, MPSVI) inaktivací příslušných genů (*GNS*, *GALNS*, *GLB1*, *ARSB*) prostřednictvím CRISPR/Cas9 technologie.

Příprava tohoto systému zahrnuje návrh CRISPR sekvencí pro tvorbu gRNA navádějících Cas9 protein do cílového místa genu určeného k editaci s dostatečnou specifitou, jejich klonování do vektorů a následně dopravení připravených plasmidů obsahujících specifické inserty do iPSC.

Dílčím cílem práce je izolovat jednotlivé klony a ověřit, zda došlo k úspěšné inaktivaci cílových genů při zachování stavu pluripotence. Dále pak určit vztah mezi typem mutace daného genu a aktivitou mutací postiženého enzymu porovnáním s kontrolními iPSC.

Dalším cílem je diferenciaci zvolených iPSC linií do buněčných typů, které mukopolysacharidy postihují. Následně porovnat morfologii a míru akumulace glykosaminoglykanů v izogenních párech.



### 3 MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Biologický materiál a plasmidy

Březí laboratorní myš E13,5 kmen 129/Sv.

Nesrážlivá žilní krev s EDTA

pSpCas9(BB)-2A-puro (PX459) V2.0 62988, Addgene

pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461) 48140, Addgene

##### 3.1.2 Chemikálie a roztoky

1,9-dimethylmethylenová modř 341088, Sigma-Aldrich

4-methylumbelliferon M1381, Sigma-Aldrich

4-nitrokatechol N15553, Sigma-Aldrich

Agarosa pro DNA elektroforézu 11404.05, SERVA

Ampicilin, sodná sůl A0166, Sigma-Aldrich

BSA, frakce V 126609, Sigma-Aldrich

DAPI, roztok 1 mg·ml<sup>-1</sup> D1306, Invitrogen

Nanášecí pufr (5X) BIO-41028, Bioline

Etanol (96%) 70390-11001, PENTA

Faloidin-iFluor 647 Ab176759, Abcam

Folin-Ciocalteuovo činidlo (15X) F9252, Sigma-Aldrich

Formaldehyd, 16% roztok 28908, Thermo Scientific

GelRed Nucleic Acid Gel Stain 41002, Biotium

Glycerin bezvodý 14530-11000, PENTA

Glycin G7403, Sigma-Aldrich

Histopaque-1077 10771, Sigma-Aldrich

Hydroxid sodný S8045, Sigma-Aldrich

HyperLadder 50 bp BIO-41026, Bioline

Chondroitin-6-sulfát, sodná sůl 27043, Sigma-Aldrich

Isopropanol 59300M1000, PENTA

Lidský IL2 600126, Abbiotec

Kozí sérum	Ab7481, Abcam
PBS pH 7.4 (1X)	10010-015, Gibco
Penicilin/Streptomycin	A2213B, Biochrom GmbH
Rekombinantní lidský IGF-1	100-11-100UG, PeproTech
Rekombinantní lidský TGF- $\beta$ 3	100-36E-10UG, PeproTech
Roti-Quant roztok (5X)	K015.1, Carl Roth GmbH
Roztok trypanové modři (0,4%)	T8154, Sigma-Aldrich
Triton X-100	T8787, Sigma-Aldrich
VTN-N rekombinantní lidský protein	414700, Gibco
Y-27632 dihydrochloride (ROCK inhibitor)	1254, Tocris
Želatina z hovězí kůže, Typ B	G9391-100G, Sigma-Aldrich

### 3.1.3 Přístroje

Analytické váhy Pioneer PA214C	OHAUS, Čína
Automatický počítač buněk LUNA-II	Logos Biosystem, Jižní Korea
Biologický termostat BT 120 M	LABsystem, Praha
Centrifuga UNIVERSAL 320R	Hettich, Německo
CO <sub>2</sub> inkubátor s přímým ohřevem Forma 310	Thermo Scientific, USA
Čtečka mikrotitračních destiček Synergy 2	BioTek Instruments, USA
Fluorescenční spektrometr LS-55	PerkinElmer, USA
Genetický analyzátor 3500 xL HITACHI	Applied Biosystems, USA
Inkubační třepačka ISS-4075R	JeioTech, Korea
Laminární box Biohazard (třída II)	CleanAir, Nizozemsko
Mikrocentrifuga MiniSpin plus	Eppendorf AG, Německo
Mikroskop Eclipse Ti-S	Nikon, Japonsko
Mikroskop Eclipse Ts2	Nikon, Čína
Váha Scout SC2020	OHAUS, USA
Spektrofotometr NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, USA
Termální cykler DNA Engine Dyad Peltier	Bio-Rad, USA
UV-VIS spektrofotometr UV-2550	Shimadzu, Německo
Zdroj pro elektroforézu MP-250V	Major Science, USA

### 3.1.4 Enzymy a související reagenty

ATP (25mM)	E3101K, Epicentre
DMSO	B0515A, New England BioLabs
DNase I	10104159001, Roche Diagnostics
DTT (10mM)	P1171, Promega
FastDigest BpiI (BbsI)	FD1014, Thermo Scientific
Kolagenasa, typ I	17018-029, Gibco
Mix dNTP	N0447S, New England BioLabs
Phusion 5X HF reakční pufr	B0518S, New England BioLabs
Phusion Hot Start Flex DNA polymerasa	M0535L, New England BioLabs
Plasmid-Safe DNase	E3101K, Epicentre
Plasmid-Safe reakční pufr 10X	E3101K, Epicentre
Reakční pufr A 10X	EK0031, Thermo Scientific
StemPro Accutase	A11105-01, Gibco
T4 polynukleotid kinasa	EK0031, Thermo Scientific
T7 DNA ligasa	M0318S, BioLabs
Tango pufr 10X	BY5, Thermo Scientific

### 3.1.5 Protilátky

Kolagen II myší mAb	MA5-12789, Invitrogen
Kozí anti-králičí IgG, Alexa Fluor 568	A11011, Invitrogen
Kozí anti-myší IgG, Alexa Fluor 488	A11001, Invitrogen
LIN-28 králičí pAb	11724-1-AP, Proteintech
Nanog myší mAb	MA1-017, Invitrogen
Oct-3/4 myší mAb	Sc-5279, Santa Cruz Biotechnology
Purifikovaný myší anti-lidský CD28	340975, BD Biosciences
Purifikovaný NA/LE myší anti-lidský CD3	555336, BD Biosciences
Sox-2 myší mAb	Sc-365823, Santa Cruz Biotechnology
SSEA-4 myší mAb	MA1-021, Invitrogen

### 3.1.6 Media a roztoky

HES medium	DMEM/F-12 (1X), GlutaMAX	31331-028, Gibco
	20 % KnockOut SR	10828-010, Gibco
	1 % MEM NEAA (100X)	11140-050, Gibco
	1 mmol·l <sup>-1</sup> 2-merkaptoetanol	31350-010, Gibco
	10 ng·ml <sup>-1</sup> FGF-2	PHG0369, Gibco
Inhibiční pufr pH 4,3	2 mol·l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	71645, Sigma-Aldrich
	2 mol·l <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	71500, Sigma-Aldrich
LB medium	1 % Pepton z kaseinu	70172, Sigma-Aldrich
	0,5 % Extrakt z droždí	70161, Sigma-Aldrich
	1 % Chlorid sodný	S3014, Sigma-Aldrich
	1 mM Hydroxid sodný	S8045, Sigma-Aldrich
LB agar	LB medium	
	1,5 % Agar	05039, Sigma-Aldrich
MEF medium	DMEM (1X), GlutaMAX	31966-021, Gibco
	10 % FBS	S0615, Biochrom GmbH
mTeSR <sup>+</sup> medium	mTeSR Plus Basal Medium	05826, STEMCELL Technologies
	20 % mTeSR Plus 5X Supplement	05827, STEMCELL Technologies
Pro-mesodermální medium	DMEM/F-12 (1X), GlutaMAX	31331-028, Gibco
	10 % FBS	S0615, Biochrom GmbH
	10 ng·ml <sup>-1</sup> FGF-2	PHG0369, Gibco
	10 ng·ml <sup>-1</sup> BMP-4	PHC9534, Gibco
	10 ng·ml <sup>-1</sup> PDGF-BB	100-14B, PeproTech
RPMI medium	RPMI 1640 (1X), Glutamax	61870-044, Gibco
	10 % FBS	S0615, Biochrom GmbH
	55 µM 2-merkaptoetanol	31350-010, Gibco
Roztok A (Lowryho metoda)	0,2 % Vinan sodno-draselný	217255, Sigma-Aldrich
	9 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> bezvodý	222321, Sigma-Aldrich
	0,45 mol·l <sup>-1</sup> NaOH	S8045, Sigma-Aldrich

Roztok B (Lowryho metoda)	2 % Vinan sodno-draselný	217255, Sigma-Aldrich
	1 % CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	209198, Sigma-Aldrich
	0,1 mol·l <sup>-1</sup> Hydroxid sodný	S8045, Sigma-Aldrich
Roztok substrátu I (HEXB) pH 4,4	0,1 mol·l <sup>-1</sup> Kyseliny citronová	C0759, Sigma-Aldrich
	0,2 mol·l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	71645, Sigma-Aldrich
	0,05 % BSA	82047, Sigma-Aldrich
	5 mmol·l <sup>-1</sup> 4-MU- <i>N</i> -acetyl-β-D-glukosaminid	M2133, Sigma-Aldrich
Roztok substrátu II (GLB1) pH 4,0	0,1 mol·l <sup>-1</sup> Kyseliny citronová	C0759, Sigma-Aldrich
	0,2 mol·l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	71645, Sigma-Aldrich
	0,1 mol·l <sup>-1</sup> Chlorid sodný	S3014, Sigma-Aldrich
	2 mmol·l <sup>-1</sup> 4-MU-β-D-galaktopyranosid	M1633, Sigma-Aldrich
Roztok substrátu III (GALNS) pH 4,3	0,1 mol·l <sup>-1</sup> Octan sodný	S2889, Sigma-Aldrich
	0,58 % Ledová kyselina octová	1.00063, Sigma-Aldrich
	0,1 mol·l <sup>-1</sup> Chlorid sodný	S3014, Sigma-Aldrich
	5 mmol·l <sup>-1</sup> Octan olovnatý	22660, Penta
	1 mmol·l <sup>-1</sup> 4-MU-β-D-galaktopyranosid-6-sulfát	68903, Sigma-Aldrich
Roztok substrátu IV (ARSB) pH 6,0	0,5 mol·l <sup>-1</sup> Octan sodný	S2889, Sigma-Aldrich
	10 mmol·l <sup>-1</sup> Octan barnatý	243671, Sigma-Aldrich
	2,9 % Ledová kyselina octová	1.00063, Sigma-Aldrich
	50 mmol·l <sup>-1</sup> 4-nitrokatecholsulfát	N7251, Sigma-Aldrich
Standardní chondrogenní medium	DMEM (1X), GlutaMAX	31966-047, Gibco
	10 % FBS	S0615, Biochrom GmbH
	50 μmol·l <sup>-1</sup> L-prolin	81709, Sigma-Aldrich
	50 μmol·l <sup>-1</sup> kyselina askorbová	A8960, Sigma-Aldrich
	1 mmol·l <sup>-1</sup> pyruvát sodný	11360-039, Gibco
	1 % ITS	41400-045, Gibco
	10 <sup>-7</sup> mol·l <sup>-1</sup> dexametazon	D4902, Sigma-Aldrich
TBE pufr (10X)	0,89 M Tris báze	T6066, Sigma-Aldrich
	0,89 M Kyselina boritá	B7901, Sigma-Aldrich
	0,02 M EDTA	15699, Affymetrix

### 3.1.7 Komerční soupravy

BigDye XTerminator Purification Kit	4376487, Applied Biosystems
Library Efficiency DH5 $\alpha$ Competent Cells	18263-012, Invitrogen
Neon Transfection System	MPK5000, Invitrogen
Neon Transfection System 100 $\mu$ L Kit	MPK10025, Invitrogen
NucleoBond Xtra Midi	7404.1050, MACHEREY-NAGEL
PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit	K220001, Invitrogen
QIAamp DNA Mini Kit	51304, QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	27106, QIAGEN
Alkaline Phosphatase Kit	86R, Sigma-Aldrich
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	4337456, Applied Biosystems
CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit	A16517, Invitrogen

## 3.2 Příprava plasmidů pro editaci iPSC systémem CRISPR/Cas9

### 3.2.1 Návrh oligonukleotidů

Nejprve byly navrženy oligonukleotidy komplementární k editovaným genům (*GNS*, *GALNS*, *GLB1* a *ARSB*), jejichž sekvence byly vyhledány v databázi Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI). Oligonukleotidy o délce 20 bází byly vybrány na základě specifity a přítomnosti PAM sekvence NGG pomocí online softwaru ([https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR\\_CUSTOM](https://eu.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM)). Navržené oligonukleotidy, byly dodány společností Geneti Biotech.

### 3.2.2 Příprava vektorů a transformace do buněk

V prvním kroku byly smíchány navržené komplementární jednovláknové oligonukleotidy (ssDNA) s T4 polynukleotid kinasou (T4 PNK) v prostředí sterilní deionizované vody (ddH<sub>2</sub>O) a reakčního pufru (Tab. 3.1). Reakce byla provedena v termálním cykleru nejprve 30 minut při 37 °C, poté 5 minut při 95 °C a následně ochlazená na 25 °C rychlostí 0,1 °C·s<sup>-1</sup>. Tímto způsobem byly připraveny dvouvláknové oligonukleotidy s přesahujícími fosforylovanými 5'-konci.

Tab. 3.1 Reakční složky syntézy dvouvláknových oligonukleotidů a odpovídající objemy.

Reakční složka	V [μl]
ssDNA oligonukleotid 1	1,0
ssDNA oligonukleotid 2	1,0
T4 PNK	1,0
Reakční pufr A 10X	1,0
ddH <sub>2</sub> O	6,0

Dvouvláknové oligonukleotidy z předchozí reakce byly zředěny a zaklonovány do vektoru pSpCas9(BB)-2A-puro (PX459) V2.0 prostřednictvím ligační reakce (Tab. 3.2). Jako restriční enzym pro linearizaci zvoleného plasmidu byl použit FastDigest BbsI, který specificky štěpí dvouvláknovou DNA v místě GAAGAC(2/6)^. Spojení dvouvláknových oligonukleotidů s linearizovaným plasmidem zajišťuje ATP-dependentní T7 DNA ligasa. Ligační reakce probíhala v termálním cyklu 5 minut při teplotě 37 °C a 5 minut při 21 °C, teplotní cyklus byl opakován šestkrát.

Tab. 3.2 Reakční složky ligace dvouvláknových oligonukleotidů do linearizovaného vektoru a jim odpovídající objemy.

Reakční složka	V [μl]
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459), (30 ng·μl <sup>-1</sup> )	2,9
Oligonukleotidový duplex (200x zředěný)	2,0
Tango pufr 10X	2,0
DTT (6,5 mmol·l <sup>-1</sup> )	1,0
ATP (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	1,0
FastDigest BbsI	1,0
T7 DNA ligasa	0,5
ddH <sub>2</sub> O	9,2

Výsledná reakční směs byla očištěna ATP-dependentní Plasmid-Safe DNasou (Tab. 3.3), která slouží pro odstranění přebytečné linearizované DNA. Tato reakce probíhala v termálním cyklu, nejprve 30 minut při 37 °C, a poté byl enzym inaktivován 30 minut při 70 °C.

Tab. 3.3 Reakční složky purifikace plasmidu obsahující insert a odpovídající objemy.

Reakční složka	V [μl]
Ligační reakce	11,0
Plasmid-Safe reakční pufr 10X	1,5
ATP (10 mmol·l <sup>-1</sup> )	1,5
Plasmid-Safe DNasa	1,0

Takto připravené plasmidy byly transformovány do chemicky kompetentních DH5α™ buněk. Transformace byla provedena použitím *Library Efficiency® DH5α Competent Cells* dle protokolu doporučeného výrobcem. Po inkubaci na ledu byl proveden teplotním šok ve 45°C vodní lázni po dobu 45 sekund. Poté bylo k buněčné suspenzi na ledu přidáno SOC medium. Následná inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C a 220 rpm na třepačce. Buňky byly vysety na Petriho misky s LB agarem obsahující 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> ampicilinu a inkubovány přes noc při 37 °C. Do 3 ml LB media s 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> ampicilinu byly z každé misky odpíchnuty klony, které byly následně zmnoženy inkubací přes noc při 37 °C a 220 rpm na třepačce. Z 500 μl suspenze byl připraven zásobní glycerolový roztok skladovaný při -80 °C. Zbylý objem buněčné suspenze sloužil pro izolaci plasmidu a kontrolní sekvenování.

### 3.2.3 Izolace a sekvenování plasmidů

Plasmidy od všech odpíchnutých klonů byly izolovány použitím *QIAprep Spin Miniprep kit* dle protokolu doporučeného výrobcem a přítomnost insertů v izolovaných plasmidech byla ověřena sekvenováním od U6 promotoru použitím primeru U6-Fwd (Tab. 3.4). Pro samotné sekvenování byly vzorky zpracovány pomocí *BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* a *BigDye XTerminator™ Purification Kit* dle protokolu doporučeného výrobcem. Sekvenování bylo provedeno na genetickém analyzátoru 3500 xL.

Dle výsledků sekvenování byl od každého insertu vybrán jeden klon, který byl následně přeočkován z glycerolového roztoku do 150 ml LB media obsahujícího 0,1 mg·ml<sup>-1</sup> ampicilinu. Suspenze byly inkubovány přes noc při 37 °C a 220 rpm na třepačce. Izolace plasmidů byla provedena použitím *NucleoBond Xtra Midi* dle protokolu doporučeného výrobcem. V závěrečném kroku byly plasmidy vysráženy nejprve isopropanolem a na závěr 70% etanolem. Po oschnutí byly sraženiny



resuspendovány ve 200 µl sterilní deionizované vody. Koncentrace plasmidů byly změřeny na spektrofotometru NanoDrop a upraveny na přibližně stejnou hodnotu. Sekvence izolovaných plasmidů byly opět ověřeny sekvenováním od U6 promotoru.

*Tab. 3.4 Sekvence primeru U6-Fwd použitého pro sekvenování vzniklých plasmidů od U6 promotoru.*

Název primeru	Sekvence primeru
U6-Fwd	GAGGGCCTATTTCCTCATGATTCC

### 3.3 Příprava buněk pro další experimenty

#### 3.3.1 Izolace a ozařování myších embryonálních fibroblastů

Myš březí 13,5 dne byla usmrcena cervikální dislokací. Po očištění myši 70% etanolem, peritoneum bylo rozříznuto a děloha byla vyjmuta do Petriho misky s PBS. Embrya byla uvolněna a očištěna od okolních tkání. Po odebrání hlavy a viscerálních orgánů byla embrya rozřezána na malé kousky. Očištěné kousky embryí byly přeneseny do 50ml zkumavky a obsah byl doplněn přidavkem MEF media na 30 ml. Po stočení byl sediment resuspendován 10 ml DMEM media s 20 % FBS, 0,2 % kolagenasy a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  DNasy I. Tato suspenze byla inkubována 1,5 hodiny při 37 °C a promíchávána každých 30 minut.

Po skončení inkubace byla směs opakovaně protlačena přes injekční jehlu (20-G) a proseta přes sítko (100 µm). Objem filtrátu byl doplněn MEF mediem na 50 ml. Po stočení byly buňky opět resuspendovány v MEF mediu a nasety na kultivační misky (ekvivalent jednoho embrya na 100mm misku). Po dvou pasážích byly buňky sklizeny, spočítány a po 3 milionech přeneseny do zamrazovacích zkumavek, které byly uchovávány do ozařování při -80 °C maximálně po dobu 1 týdne.

Izolované myší embryonální fibroblasty byly ozářeny 38 Gy na suchém ledu  $^{60}\text{Co}$  zářičem. Po ozáření byly buňky uchovávány v tekutém dusíku.

V případě potřeby byly zkumavky rozmrazeny, stočeny, resuspendovány v MEF mediu a nasety na destičky pokryté pomocí 0,1% roztoku želatiny hustotou cca  $20000 \text{ buněk}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Takto připravené ozářené myší embryonální fibroblasty (iMEF, irradiated mouse embryonic fibroblasts) byly využívány jako výživné buňky pro podporu nediferencovaných iPSC.

### 3.3.2 Izolace a reprogramování lidských PBMC

Z 5 ml krve zdravých jedinců byly izolovány PBMC. Ve zkumavce byl roztok Histopaque převrstven krví s EDTA v poměru 1:1. Směs byla centrifugována 30 minut při 400 ref a 25 °C. Po stočení byla odsátá vrstva séra a vrstva obsahující PBMC byla přenesena do nové zkumavky s PBS a suspenze byla centrifugována 10 minut při 250 ref a 25 °C.

Reprogramování izolovaných PBMC bylo provedeno prostřednictvím Sendai virů s použitím *CytoTune™-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit* dle publikovaného protokolu<sup>64</sup>.

Nejprve byla připravena destička ošetřena tkáňovou kulturou, která byla přes noc pokryta PBS obsahujícím 5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  CD3, následně byla inkubována v blokovacím 2% roztoku BSA po dobu 30 minut a opakovaně omyta PBS.

Peleta PBMC byla resuspendována v RPMI mediu obsahujícím 50  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  IL2, 0,4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  CD3 a CD28 (stimulační RPMI medium), suspenze byla přenesena na připravenou destičku. Množství buněk v destičce bylo spočítáno a upraveno na 1–4 miliony buněk na jamku. Stimulační RPMI medium bylo dle potřeby doplňováno nebo vyměňováno po dobu 3 dní.

Následující den byly buňky stočeny, resuspendovány ve stimulačním RPMI mediu a spočítány. Suspenze byla přenesena na novou destičku připravenou stejně jako v předchozím případě. Na každou jamku připadalo 150 000 buněk a do každé jamky bylo přidáno 150  $\mu\text{l}$  reprogramovací směsi obsahující částice Sendai viru KOS, hc-Myc a hKlf4 v poměru 5:5:3. Druhý den bylo vyměněno stimulační RPMI medium bez virových částic.

Dva dny poté byly buňky přeneseny v HES mediu na destičku pokrytou iMEF. Následující dny bylo HES medium dle potřeby doplňováno nebo vyměňováno. Izolace narostlých kolonií se správnou morfologií byla provedena opakovaným odpichováním na destičky pokryté iMEF.

Takto připravené buňky byly využity jako kontrolní iPSC pro další experimenty.

### 3.4 Transfekce plasmidů do iPSC

Transfekce plasmidů do iPSC byla provedena metodou elektroporace s použitím *Neon Transfection System 100 µL Kit* a *Neon Transfection System*. Podmínky elektroporace byly zvoleny dle doporučení výrobce a dále optimalizovány pro vybranou kontrolní linii iPSC.

Nejprve byla provedena transfekce plasmidu pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461), který umožňuje monitorování výsledků elektroporace detekcí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP, green fluorescent protein) produkovaného úspěšně transfekovanými buňkami.

Kontrolní iPSC byly sklizeny akutasou do 50ml zkumavky a obsah byl doplněn přídatkem PBS na 30 ml. Množství živých buněk v suspenzi s přídatkem trypanové modři bylo vypočteno na přístroji LUNA-II. Suspenze byla centrifugována 5 minut při 300 rcf a 25 °C. Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány v resuspendačním pufru.

Elektroporace byla provedena za různých podmínek, jako optimalizační parametry byly zvoleny počet, délka a napětí pulsů. Pro každou elektroporaci bylo použito  $7 \cdot 10^5$  buněk a 8 µg plasmidu. Poté byly buňky přeneseny na vitronektinem pokrytou destičku obsahující medium mTeSR<sup>+</sup> s  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  ROCK inhibitoru.

Vliv optimalizačních parametrů na účinnost transfekce byl ověřen po 24 hodinách průtokovou cytometrií.

Na základě výsledků byly zvoleny optimální parametry elektroporace vytvořených plasmidů do kontrolních iPSC. Transfekce byla provedena podobně jako v předchozím případě. V posledním kroku byly elektroporované buňky přeneseny na destičku pokrytou iMEF obsahující HES medium. Po 24 hodinách byla provedena selekce úspěšně transfekovaných buněk použitím HES media obsahující  $2,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  puromycinu. Následně bylo HES medium vyměňováno každých 48 hodin. Výběr klonů byl proveden odpichováním kolonií. Pro charakterizaci a další experimenty byly zvoleny nejlépe rostoucí klony se správnou morfologií.

Tímto způsobem byly vytvořeny iPSC modely pro MPS IIID, MPS IVA, MPS IVB a MPS VI.

### 3.5 Charakterizace iPSC modelů MPS

#### 3.5.1 Amplifikace, purifikace a sekvenování cílových fragmentů gDNA

Kontrolní a geneticky modifikované buněčné linie byly sklizeny pomocí akutasy, přeneseny do 1,5ml zkumavek a centrifugovány 5 minut při pokojové teplotě a 300 rcf v mikrocentrifuze. Po odsátí supernatantu byly buněčné pelety resuspendovány v PBS. Suspenze buněk byly použity pro izolaci genomových DNA, která byla provedena prostřednictvím *QIAamp DNA Mini Kit* dle protokolu doporučeného výrobcem. V závěrečném kroku byla provedena eluce gDNA deionizovanou vodou.

Koncentrace izolovaných gDNA byly změřeny na spektrofotometru NanoDrop a upraveny na přibližně stejnou hodnotu. Takto připravené gDNA byly využity jako templáty pro amplifikaci oblastí postižených mutací. Podmínky polymerázových řetězových reakcí (PCR, polymerase chain reaction) byly optimalizovány pro jednotlivé dvojice primerů (*Tab. 3.7*), které byly dodány společností Generi Biotech. Primery a podmínky PCR byly navrženy dle příslušných publikací<sup>65–67</sup> (*Tab. 3.5*, *Tab. 3.6*).

*Tab. 3.5 Reakční složky PCR a jim odpovídající objemy pro jednu 50μl reakci.*

Složka reakce	<i>V</i> [μl]
ddH <sub>2</sub> O	29,5
HF reakční pufr 5X	10,0
Mix dNTP (10 mM)	1,5
DMSO	1,5
Primer FW (10 uM)	2,5
Primer RV (10 uM)	2,5
Phusion Hot Start Flex DNA polymerasa	0,5
Templát gDNA (50-250 ng)	2,0

Tab. 3.6 Teplotní program PCR.

Krok reakce	Teplota	Čas	Opakování
Úvodní denaturace	95 °C	30 s	1x
Denaturace	95 °C	10 s	35x
Nasedání primerů	62–64 °C*	25 s	
Elongace	70 °C	25 s	
Finální elongace	70 °C	7 min	1x
Chlazení	8 °C	∞	1x

\* 62 °C pro primery GNS\_E1\_FW/RV a GLB1\_E2\_FW/RT

64 °C pro primery GALNS\_E1\_FW/RV a ARSB\_E1\_FW/RT

Tab. 3.7 Názvy a sekvence primerů použitých k amplifikačním a sekvenačním reakcím. Primer GLB1\_E2\_FW resp. GLB1\_E2\_RV obsahuje navíc sekvenci (tučně vyznačeno), která umožňuje sekvenování univerzálním primerem T7 resp. RP.

Název primeru	Sekvence primeru
GNS_E1_FW	CTTCAAGGCACGGCTTTTTA
GNS_E1_RV	CATAAAGGGCCTCAGGTGG
GALNS_E1_FW	GCCCCACTGGTCACGAGGCAGTCCA
GALNS_E1_RV	CCCACCCCGGCCCTGCCCCGTCCCACCGCCCGCACTCA
GLB1_E2_FW	<b>TAATACGACTCACTATAGCT</b> CCCTCTTATCCATGTGTT
GLB1_E2_RV	<b>TGAAACAGCTATGACCATGGAATGCAGGTCTGCTTTAAT</b>
ARSB_E1_FW	GCAGCCCAGTTCCTCATTCTAT
ARSB_E1_RV	GCCTGGAAGAGCGAGGTT

Čistota fragmentů a specifita PCR byla ověřena gelovou elektroforézou. Pro kontrolu velikosti fragmentů byl použit *HyperLadder 50 bp*, který byl společně se PCR produkty míchán s *Loading Dye 5X* a nanesen na 1% agarosový gel s přídavkem barviva GelRed. Elektroforéza probíhala 35 minut při 100 V.

Produkty amplifikačních reakcí byly přečištěny s použitím *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* dle protokolu doporučeného výrobcem. V závěrečném kroku byla provedena eluce PCR produktů do elučního pufru.

Pro potvrzení přítomnosti mutace byly přečištěné PCR produkty podrobeny obousměrnému sekvenování. Jako sekvenační primery byly použity primery amplifikačních reakcí (Tab. 3.7) a univerzální sekvenační primery T7 a RP.

### 3.5.2 Testování enzymatických aktivit

Kontrolní iPSC a buňky obsahující mutaci genu *GALNS*, *GLB1* a *ARSB* byly sklizeny pomocí akutasy, přeneseny do 1,5ml zkumavek a centrifugovány 5 minut při pokojové teplotě a 300 rcf v mikrocentrifuze. Buněčné pelety byly resuspendovány v deionizované vodě a homogenizovány. V každém homogenátu byl stanoven celkový protein a následně byla změřena aktivita kontrolního enzymu a enzymu postiženého mutací příslušného genu (Tab. 3.8).

Tab. 3.8 Přehled testovaných enzymů v liniích obsahujících mutaci příslušného genu.

Mutovaný gen	Kontrolní enzym	Postižený enzym
<i>GALNS</i>	$\beta$ -galaktosidasa	<i>N</i> -acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasa
<i>GLB1</i>	$\beta$ -hexosaminidasa	$\beta$ -galaktosidasa
<i>ARSB</i>	$\beta$ -galaktosidasa	arylsulfatasa B

### Celkový protein

Celkový protein ve všech homogenátech byl stanoven modifikovanou Lowryho metodou<sup>68</sup>. Nejprve byla připravena kalibrační řada pomocí roztoku hovězího sérového albuminu (BSA, bovine serum albumin) o koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Tab. 3.9). Následně bylo k 5  $\mu\text{l}$  homogenátu přidáno 195  $\mu\text{l}$  deionizované vody. Vzorky v dubletech byly inkubovány s 200  $\mu\text{l}$  reakčního roztoku A po dobu 10 minut při  $50^\circ\text{C}$ , poté s 20  $\mu\text{l}$  reakčního roztoku B 10 minut při laboratorní teplotě a s 600  $\mu\text{l}$  zředěného Folin-Ciocalteuova činidla 10 minut při  $50^\circ\text{C}$ . Následně provedeno měření absorbance při 650 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-2550.

Množství celkového proteinu ve vzorcích bylo vypočteno z kalibrační závislosti.

Tab. 3.9 Příprava kalibrační řady pomocí roztoku BSA o koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

<b><i>c</i> (BSA) [<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	0	25	50	75	100
<b><i>V</i> (BSA) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	0	50	100	150	200
<b><i>V</i> (H<sub>2</sub>O) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	200	150	100	50	0

### Aktivita $\beta$ -hexosaminidasy

Homogenáty kontrolní linie a linií obsahující mutaci genu *GLBI* byly zředěny na koncentraci celkového proteinu  $0,02 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Poté bylo provedeno testování aktivity  $\beta$ -hexosaminidasy dle publikovaného protokolu<sup>69</sup>.

Nejprve bylo smícháno 20  $\mu\text{l}$  homogenátu s 20  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu I a 20  $\mu\text{l}$  deionizované vody s 20  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu I. Vzorky byly inkubovány 15 minut při 37 °C. Reakce byly zastaveny přidáním 600  $\mu\text{l}$  stopovacího 0,2M glycinového pufru (pH 10,6). Kalibrační řada byla připravena pomocí roztoku 4-methylumbelliferonu (4MU) o koncentraci  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tab. 3.10). Fluorescence uvolněného 4MU a kalibrace byla změřena při 365/448 nm (ex/em) na fluorescenčním spektrofotometru LS-55.

Koncentrace 4MU ve vzorku byla vypočtena na základě získané kalibrační křivky.

Tab. 3.10 Příprava kalibrační řady pomocí roztoku 4MU o koncentraci  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

<b>c (4MU) [<math>\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}</math>]</b>	0,2	0,4	0,6
<b>V (4MU) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	240	240	360
<b>V (stopovací pufr) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	960	360	240

Aktivita  $\beta$ -hexosaminidasy byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{(c_{\text{vz}} - c_{\text{bl}}) \cdot V}{m \cdot \tau} = \frac{(c_{\text{vz}} - c_{\text{bl}}) \cdot 2,56}{m},$$

kde  $c_{\text{vz}}$  je koncentrace 4MU ve vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $c_{\text{bl}}$  je koncentrace 4MU ve slepém vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $V$  je konečný reakční objem (ml),  $m$  je množství celkového proteinu v reakci (mg) a  $\tau$  je reakční čas (h).

### Aktivita $\beta$ -galaktosidasy

Homogenáty kontrolní linie a linií obsahujících mutaci genu *GALNS*, *GLBI* a *ARSB* byly zředěny na koncentraci celkového proteinu  $0,05 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Poté bylo provedeno testování aktivity  $\beta$ -galaktosidasy dle publikovaného protokolu<sup>69</sup>.

Nejprve bylo smícháno 20  $\mu\text{l}$  homogenátu s 20  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu II a 20  $\mu\text{l}$  deionizované vody s 20  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu II. Vzorky byly inkubovány 30 minut při 37 °C. Reakce byly zastaveny přidáním 600  $\mu\text{l}$  stopovacího 0,2M glycinového pufru (pH 10,6). Fluorescence uvolněného 4MU byla změřena při 365/448 nm (ex/em) na fluorescenčním spektrofotometru LS-55.

Pro výpočet koncentrace 4MU ve vzorku byla použita kalibrační závislost z předchozího stanovení (Tab. 3.10).

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{(c_{\text{vz}} - c_{\text{bl}}) \cdot V}{m \cdot \tau} = \frac{(c_{\text{vz}} - c_{\text{bl}}) \cdot 1,28}{m},$$

kde  $c_{\text{vz}}$  je koncentrace 4MU ve vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $c_{\text{bl}}$  je koncentrace 4MU ve slepém vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $V$  je konečný reakční objem (ml),  $m$  je množství celkového proteinu v reakci (mg) a  $\tau$  je reakční čas (h).

### Aktivita *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy

Homogenáty kontrolní linie a linií obsahující mutaci genu *GALNS* byly zředěny na koncentraci celkového proteinu  $2 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Poté bylo provedeno testování aktivity *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy dle publikovaného protokolu<sup>70</sup>.

Nejprve bylo smícháno 10  $\mu\text{l}$  zředěného homogenátu s 20  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu III. Vzorky byly inkubovány 17 hodin při 37 °C. Poté byly přidány 2  $\mu\text{l}$  inhibičního pufru. Následně bylo do reakce dodáno 10  $\mu\text{g}$  zdroje  $\beta$ -galaktosidasy v podobě homogenátu fibroblastů pacienty s prokázaným deficitem *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy. Druhá inkubace probíhala 2 hodiny při 37 °C a byla ukončena přidávkem 600  $\mu\text{l}$  stopovacího 0,2M glycinového pufru (pH 10,6). Fluorescence uvolněného 4MU byla změřena při 365/448 nm (ex/em) na fluorescenčním spektrofotometru LS-55.

Pro výpočet koncentrace 4MU ve vzorku byla použita kalibrační závislost (Tab. 3.10).

Aktivita *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot 17 \text{ h}^{-1}] = \frac{(c_{\text{vz}} - c_{\text{bl}}) \cdot V}{m} = \frac{(c_{\text{vz}} - c_{\text{bl}}) \cdot 0,642}{m},$$

kde  $c_{\text{vz}}$  je koncentrace 4MU ve vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $c_{\text{bl}}$  je koncentrace 4MU ve slepém vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ),  $V$  je konečný reakční objem (ml) a  $m$  je množství celkového proteinu v reakci (mg).



## Aktivita arylsulfatasy B

Homogenáty kontrolní linie a linií obsahujících mutaci genu *ARSB* byly zředěny na koncentraci celkového proteinu  $3 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ . Poté bylo provedeno testování aktivity arylsulfatasy B dle publikovaného protokolu<sup>71</sup>.

Dublety vzorků byly připraveny smícháním 50  $\mu\text{l}$  homogenátu s 50  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu IV. Vzorky byly inkubovány 30 minut a 90 minut při 37 °C. Reakce byly zastaveny přidáním 900  $\mu\text{l}$  1M NaOH. Ke každému vzorku byl připraven enzymový blank bez inkubace smícháním 50  $\mu\text{l}$  homogenátu s 900  $\mu\text{l}$  1M NaOH a 50  $\mu\text{l}$  roztoku substrátu III. Vzorky byly centrifugovány 5 minut při pokojové teplotě a 6700 rcf v mikrocentrifuze. Kalibrační řada byla připravena pomocí roztoku 4-nitrokatecholu (4NC) o koncentraci  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (Tab. 3.11). Absorbance uvolněného 4NC a kalibrace byla měřena při 515 nm na UV-VIS spektrofotometru UV-2550.

Tab. 3.11 Příprava kalibrační řady pomocí roztoku 4NC o koncentraci  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

<b><math>c</math> (4NC) [<math>\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}</math>]</b>	0	5	10	15	20
<b><math>V</math> (4NC) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	-	10	20	30	40
<b><math>V</math> (<math>\text{H}_2\text{O}</math>) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	500	490	480	470	460
<b><math>V</math> (stopovací pufr) [<math>\mu\text{l}</math>]</b>	500	500	500	500	500

Aktivita arylsulfatasy B byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{\left( \frac{(A^{90} - A^{60}) - 0,2 K}{a} \right) - b}{m},$$

kde  $A^{90} - A^{60}$  je rozdíl absorbancí 4NC,  $a$  a  $b$  jsou číselné koeficienty rovnice kalibrační přímky,  $m$  je množství proteinu (mg) a  $K$  je úsek na ose  $y$  ze závislosti absorbance ( $A_{515}$ ) na době inkubace.

### 3.5.3 Detekce exprese znaků pluripotence

Kontrolní a vybraných geneticky modifikované iPSC byly přeneseny na destičku pokrytou iMEF. Po rozrostení kolonií bylo provedeno imunofluorescenční barvení pomocí protilátek specifických k vybraným znakům pluripotence (Tab. 3.12). Buňky byly několikrát opláchnuty PBS, poté byla provedena fixace inkubací ve 4% formaldehydu (10 minut, 4 °C) a 0,2% roztoku Triton X-100 (15 minut, pokojová teplota). Následně byly buňky inkubovány v 10% kozím séru po dobu 1 hodiny při

37 °C. Po odsátí blokovacího roztoku byly přidány naředěné primární protilátky a destička byla inkubována přes noc při 4 °C. Po oplachu PBS byly přidány sekundární protilátky a inkubace probíhala 1 hodinu při 37 °C ve tmě. Na závěr byly buňky několikrát opláchnuty PBS a předposlední oplach obsahoval 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  DAPI (15 minut, 37 °C).

Tab. 3.12 Protilátky použité pro imunofluorescenci znaků pluripotence a jejich ředění.

Primární Ab	Ředění 1°Ab	Sekundární Ab	Ředění 2°Ab
LIN-28 králičí pAb	1:200	Anti-králičí IgG	1:1000
Nanog myší mAb	1:50	Anti-myší IgG	1:1000
Oct-3/4 myší mAb	1:50	Anti-myší IgG	1:1000
Sox-2 myší mAb	1:50	Anti-myší IgG	1:1000
SSEA-4 myší mAb	1:75	Anti-myší IgG	1:1000

Pro demonstraci aktivity alkalické fosfatasy (ALP) bylo provedeno barvení kontrolních a geneticky modifikovaných iPSC pomocí *Alkaline Phosphatase Kit* dle doporučení výrobce.

### 3.6 Tvorba a charakterizace buněčných modelů MPS odvozených od iPSC

#### 3.6.1 Chondrogenní diferenciaci iPSC

Vytvořené a charakterizované iPSC modely vybraných mukopolysacharidos byly společně s kontrolními iPSC použity pro tvorbu buněk podobných chondrocytům. Diferenciaci probíhala přes jednovrstevnou kulturu dle publikovaného protokolu<sup>72</sup>.

Buňky byly pasážovány na vitronektinem pokrytou destičku obsahující medium mTeSR<sup>+</sup> s 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  ROCK inhibitoru. Od dalšího dne bylo medium mTeSR<sup>+</sup> vyměňováno denně. Chondrogenese byla zahájena při 80-90% pokrytím jamky a buňky byly kultivovány v pro-mesodermálním mediu po dobu jednoho týdne. Medium bylo vyměňováno každých 48 hodin.

Následující týden bylo medium nahrazeno standardním chondrogenním médiem obsahujícím 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3. Třetí týden byly buňky pěstovány ve standardním chondrogenním mediu doplněném 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  TGF- $\beta$ 3 a 10  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  IGF-1. Po skončení diferenciaci byly buňky dále kultivovány ve standardním chondrogenním mediu bez faktorů, pro prohloubení fenotypu.

Takto připravené buňky podobné chondrocytům odvozené od iPSC byly využity pro další experimenty.

### 3.6.2 Imunofluorescence znaku chondrocytů a glykosaminoglykanů

Nediferencované kontrolní iPSC, diferencované kontrolní a geneticky modifikované buňky byly přeneseny do kultivační komůrky. Po 100% pokrytí sklíčka buňkami bylo provedeno imunofluorescenční barvení (Tab. 3.13) dle postupu uvedeného v kapitole 3.5.3 (s. 49). Do roztoku obsahující sekundární protilátky byl navíc přidán faloidin v poměru 1:1000.

Tab. 3.13 Protilátky použité pro imunofluorescenci znaku chondrocytů (COL2) a glykosaminoglykanů (heparan sulfát - HS, chondroitin sulfát - CS).

Primární Ab	Ředění 1°Ab	Sekundární Ab	Ředění 2°Ab
COL2 myší mAb	1:200	Anti-myší IgG	1:1000
HS myší mAb	1:100	Anti-myší IgG	1:1000
CS myší mAb	1:100	Anti-myší IgG	1:1000

### 3.6.3 Fotometrické stanovení glykosaminoglykanů

Diferencované kontrolní buňky a *knock-out* buněčné modely byly společně s jejich nediferencovanými ekvivalenty sklizeny pomocí akutasy, přeneseny do 1,5ml zkumavek a centrifugovány 5 minut při pokojové teplotě a 300 rcf v mikrocentrifuze MiniSpin. Buněčné pelety byly resuspendovány v deionizované vodě a homogenizovány. V každém homogenátu byl stanoven celkový protein a následně byla změřena koncentrace glykosaminoglykanů.

Celkový protein v homogenátech byl stanoven Bradfordovou metodou pomocí reakčního činidla RotiQuant<sup>73</sup>. Nejprve byla připravena kalibrační řada pomocí roztoku BSA o koncentraci 1 mg·ml<sup>-1</sup> (Tab. 3.14). Následně bylo k 10 µl homogenátu přidáno 490 µl deionizované vody. Poté bylo 50 µl zředěných vzorků a kalibračních roztoků v dubletech inkubováno s 200 µl zředěného roztoku Roti-Quant po dobu 5 minut při pokojové teplotě v 96-jamkové destičce. Měření absorbance při 595 nm bylo provedeno na čtečce mikrotitračních destiček.

Množství celkového proteinu ve vzorcích bylo vypočteno z kalibrační závislosti.

Tab. 3.14 Příprava kalibrační řady pomocí roztoku BSA o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

<b><math>c \text{ (BSA)} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]</math></b>	0	10	20	30	40	60	80	100
<b><math>V \text{ (BSA)} [\mu\text{l}]</math></b>	-	10	20	30	40	60	80	100
<b><math>V \text{ (H}_2\text{O)} [\mu\text{l}]</math></b>	1000	990	980	970	960	940	920	900

Homogenáty byly zředěny na podobnou koncentraci celkového proteinu. Poté bylo provedeno stanovení glykosaminoglykanů<sup>74</sup>. Nejprve byla připravena kalibrační řada pomocí roztoku chondroitin-6-sulfátu (CHS) o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Tab. 3.15). Následně bylo k  $10 \mu\text{l}$  homogenátu přidáno  $10 \mu\text{l}$  deionizované vody. Poté bylo  $20 \mu\text{l}$  vzorků smícháno s  $200 \mu\text{l}$  reakční směsi obsahující roztok dimethylmethylenové modři o koncentraci  $31 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a roztok Tris-báze o koncentraci  $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  v poměru 10:1. Absorbance všech vzorků byla změřena při  $520 \text{ nm}$ .

Koncentrace glykosaminoglykanů ve vzorcích byla vypočtena na základě získané kalibrační závislosti a vztažena na množství celkového proteinu.

Tab. 3.15 Příprava kalibrační řady pomocí roztoku CHS o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

<b><math>c \text{ (CHS)} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]</math></b>	0	10	20	30	40	50	60
<b><math>V \text{ (CHS)} [\mu\text{l}]</math></b>	-	10	20	30	40	50	60
<b><math>V \text{ (H}_2\text{O)} [\mu\text{l}]</math></b>	1000	990	980	970	960	950	940

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1 Inaktivace genů *GNS*, *GALNS*, *GLB1* a *ARSB* systémem CRISPR/Cas9

Nejprve byly nalezeny cílové sekvence genů *GNS*, *GALNS*, *GLB1* a *ARSB* optimální pro jejich editaci systémem CRISPR/Cas9. Dle těchto sekvencí byly navrženy komplementární dvojice oligonukleotidů obsahující navíc přesahy, které umožňují inserci do cílového vektoru pSpCas9(BB)-2A-puro (PX459) V2.0 (Tab. 4.1). Účelem těchto oligonukleotidů je kódování odpovídajících gRNA navádějících protein Cas9 do cílového místa určeného pro editaci.

Tab. 4.1 Sekvence navržených oligonukleotidů, odpovídající cílový gen a modelované onemocnění. Oligonukleotidy obsahují sekvenci komplementární k editovanému genu (velká písmena) a přesahy na 5' koních umožňují ligaci do vektoru (malá písmena).

Onemocnění	Gen	Sekvence oligonukleotidu
MPS IIID	<i>GNS</i>	5'-caccgCGTGAGGAGCAGCACACGT-3' 3'-cGCACTCCTCGTCGTGGTGCAcaaa-5'
MPS IVA	<i>GALNS</i>	5'-caccgCGGTTGTCTCGGGCGACGAGG-3' 3'-cGCCAACAGCGCCGCTGCTCCcaaa-5'
MPS IVB	<i>GLB1</i>	5'-caccgCGGGACTCCTTCCTCAAGGA-3' 3'-cGCCCTGAGGAAGGAGTTCCTcaaa-5'
MPS VI	<i>ARSB</i>	5'-caccGACCTAGGCTGGAACGACGT-3' 3'-CTGGATCCGACCTTGCTGCACaaa-5'

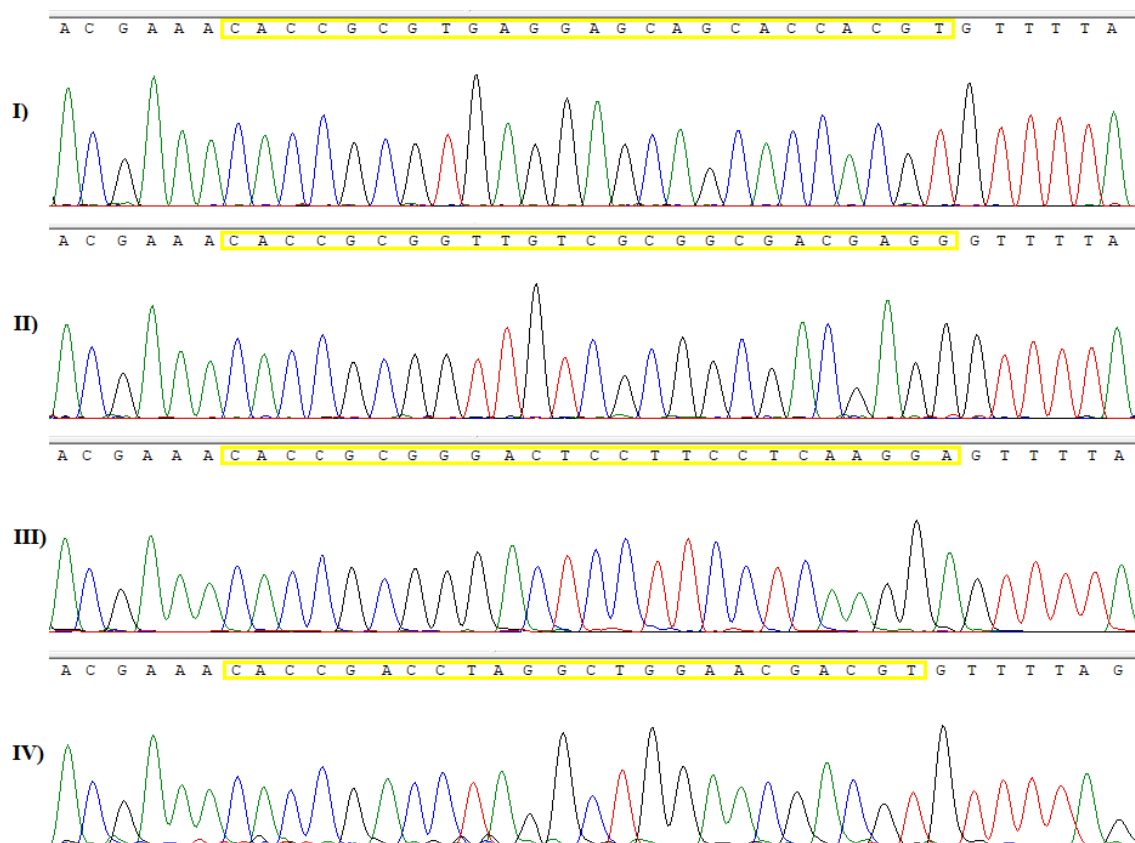
Následně byly připraveny plasmidy obsahující specifické inserty prostřednictvím série reakcí zahrnujících syntézu dvouřetězcových oligonukleotidů, linearizaci plasmidu, ligaci s inserty a přečištění výsledných plasmidů.

Poté byla provedena *in vitro* transformace plasmidů do chemicky kompetentních bakterií teplotním šokem. Po inkubaci vyrostly na miskách desítky kolonií a jednotlivé klony byly izolovány odpichováním. Inkubace vždy probíhala v prostředí s obsahem ampicilinu, který zajišťuje selekci úspěšně transfekovaných buněk díky přítomnosti genu pro ampicilinovou resistenci v plasmidu. Na základě výsledků kontrolního sekvenování byly vybrány 4 klony (pro každý insert jeden). Po namnožení vybraných klonů byly cílové plasmidy izolovány a po úpravě koncentrace sekvenovány (Tab. 4.2).

Tab. 4.2 Izolované plasmidy a jim odpovídající poměry absorbancí a koncentrace.

Označení plasmidu	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	$c$ [ng·μl <sup>-1</sup> ]
pSpCas9-GNS	1,85	2,36	1066
pSpCas9-GALNS	1,86	2,38	1094
pSpCas9-GLB1	1,77	2,23	1083
pSpCas9-ARSB	1,92	2,32	1067

Koncentrace izolovaných plasmidů byla pomocí spektrofotometru NanoDrop upravena na cca 1,1 μg·μl<sup>-1</sup>. Měření také prokázalo, že poměr absorbancí při 260 nm a 230 nm ve všech případech přesahuje hodnotu 2,0 a vzorky plasmidů tedy neobsahují významné množství kontaminantů absorbujících při 230 nm. Poměr absorbancí při 260 nm a 280 nm se pohybuje v optimálních mezích, pouze v jednom případě je hodnota mírně snížena, což poukazuje na zvýšené množství např. proteinů.



Obr. 4.1 Ukázky sekvencí plasmidů obsahujících inserty (žlutá) specifické pro vybranou oblast genu GNS (I), GALNS (II), GLB1A (III) a ARSB (IV).

Kontrolní Sangerovo sekvenování izolovaných plasmidů od U6 promotoru prokázalo přítomnost specifických insertů (Obr. 4.1). Čistota sekvence poukazuje na původ plasmidu z jednoho klonu. Dle poměrů absorbancí a výsledků sekvenování lze izolované plasmidy považovat za vhodné pro další experimenty.

Takto připravené plasmidy společně se zvolenou metodou transfekce umožňují dopravení systému CRISPR/Cas9 do iPSC a tím i editaci jejich genomu v oblasti komplementární k danému insertu.

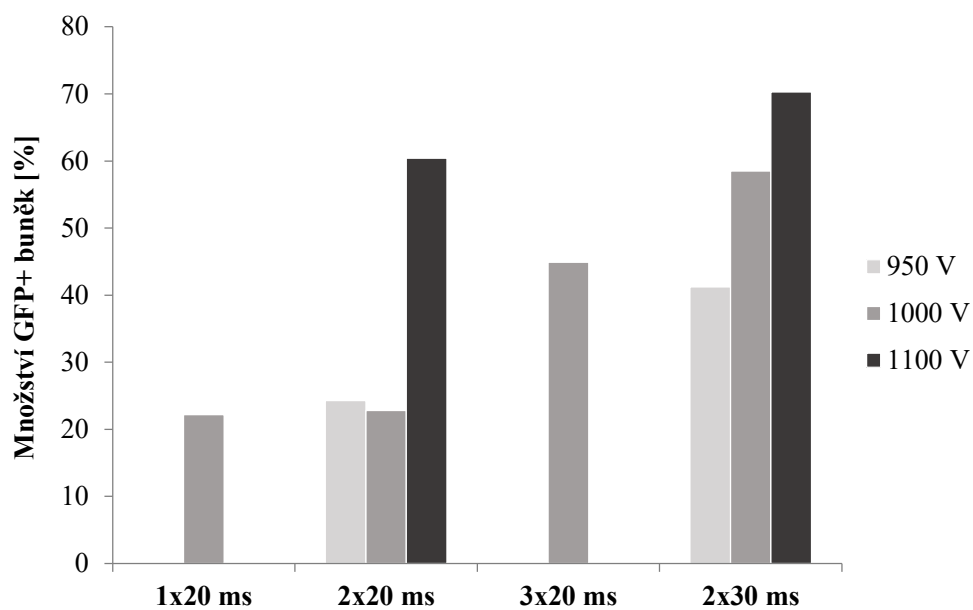
Po ověření čistoty a správnosti insertů byla provedena transfekce vytvořených plasmidů do kontrolních iPSC metodou elektroporace. Podmínky elektroporace byly zvoleny na základě výsledků transfekce plasmidu pSpCas9n(BB)-2A-GFP (PX461) do iPSC za různých podmínek (Tab. 4.3).

Pro každou elektroporační reakci bylo použito  $7 \cdot 10^5$  živých buněk, jejichž počet byl zvolen dle doporučení výrobce použitého kitu. Množství plasmidu bylo použito dle koncentrace zásobního roztoku plasmidu ( $0,8 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ), protože maximální povolený objem plasmidu ve 100  $\mu\text{l}$  elektroporační reakci je 10  $\mu\text{l}$ .

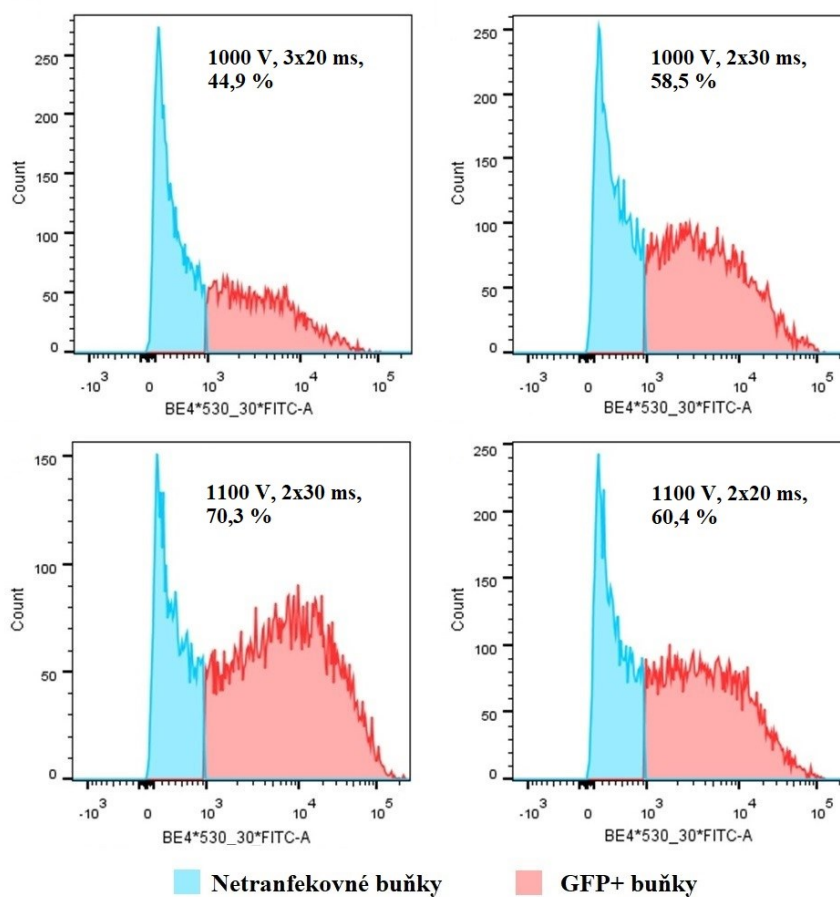
Závislost intenzity, počtu a délky pulsů na úspěšnosti elektroporace byla otestována po 24 hodinách průtokovou cytometrií, protože intenzita fluorescence GFP je přímo úměrná jeho expresi úspěšně transfekovanými buňkami (Obr. 4.2, Obr. 4.3).

*Tab. 4.3 Optimalizované parametry elektroporace a jim odpovídající množství buněk produkujících GFP (GFP+) z celkového počtu živých buněk.*

Množství plasmidu	Napětí pulsu	Počet pulsů	Délka pulsu	Množství GFP+ buněk
8 $\mu\text{g}$	1000 V	1	20 ms	22,2 %
8 $\mu\text{g}$	1000 V	2	20 ms	22,8 %
8 $\mu\text{g}$	1000 V	3	20 ms	44,9 %
8 $\mu\text{g}$	950 V	2	30 ms	41,2 %
8 $\mu\text{g}$	1000 V	2	30 ms	58,5 %
8 $\mu\text{g}$	1100 V	2	30 ms	70,3 %
8 $\mu\text{g}$	950 V	2	20 ms	24,3 %
8 $\mu\text{g}$	1100 V	2	20 ms	60,4 %
-	1000 V	2	20 ms	0,44 %
-	-	-	-	0,07 %



Obr. 4.2 Závislost množství buněk produkujících GFP (GFP+) z celkového množství živých buněk na intenzitě, počtu a délce pulsů.



Obr. 4.3 Výsledky průtokové cytometrie zobrazující množství buněk produkujících GFP a netransfekovaných buněk v závislosti na použitých parametrech elektroporace.



Z výsledků průtokové cytometrie vyplývá, že úspěšnost transfekce plasmidu do iPSC roste s rostoucím počtem pulsů a jejich délkou. Dále bylo zjištěno, že množství buněk produkujících GFP roste i s rostoucím napětím pulsů, pouze při aplikaci dvou 20ms pulsů došlo zvýšením napětí z 900 V na 1000 V k mírnému poklesu úspěšnosti transfekce. Podmínky elektroporace jedním 20ms pulsem s napětím 1000 V, jedním 20ms pulsem s napětím 950 V a dvěma 20ms pulsy s napětím 1000 V dosahují srovnatelné míry úspěšnosti transfekce.

Z testovaných podmínek nejvyšší účinnosti dosahuje elektroporace při použití dvou 30ms pulsů s napětím 1100 V, proto byly tyto parametry zvoleny pro následující transfekci plasmidů obsahujících specifické inserty do kontrolních iPSC.

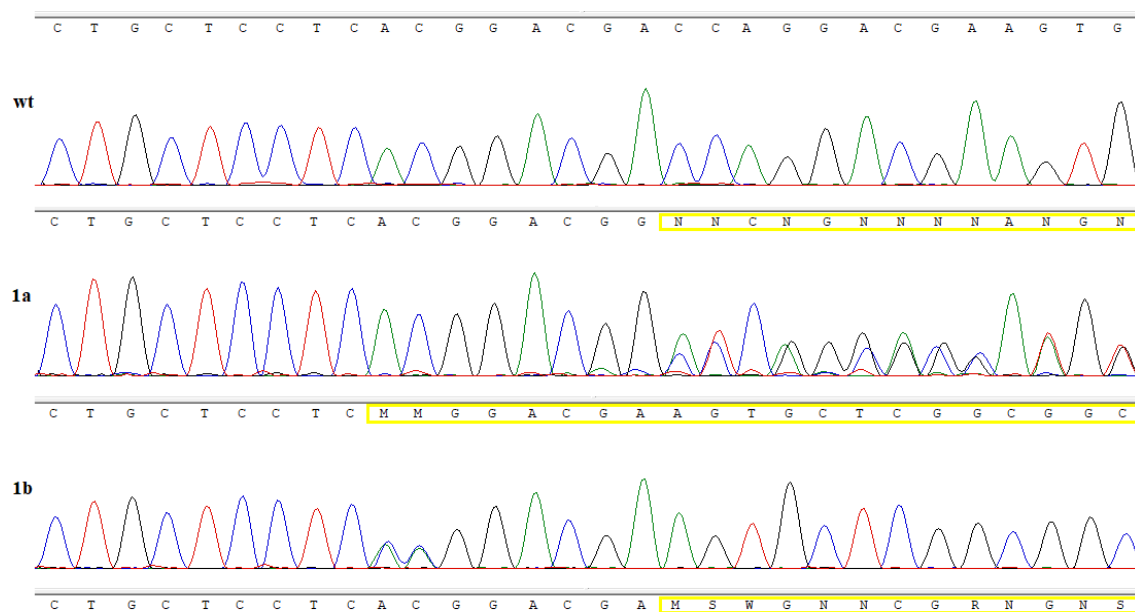
Vyšší parametry pulsů nebyly testovány, s ohledem na vitalitu a stav buněk, se kterými bude po transfekci dále manipulováno. Navíc, dosažená úspěšnost transfekce je pro naše účely dostačující.

Po elektroporaci následovala puromycinová selekce úspěšně transfekovaných buněk, kterou umožňuje přítomnost genu pro dočasnou puromycinovou rezistenci v transfekovaných buňkách. Vliv puromycinu potvrdilo odumíráním iMEF, které bylo nutné po skončení selekce doplnit, protože nedisponují puromycinovou rezistencí. Za několik dní se začaly tvořit první kolonie přeživších buněk. Jednotlivé klony byly poté izolovány opakovaným odpichováním a rozpěstovány. Pro potvrzení přítomnosti mutace v cílových genech a pro další experimenty byly vybrány tři nejlépe rostoucí klony se správnou morfologií od každého transfekčního plasmidu.

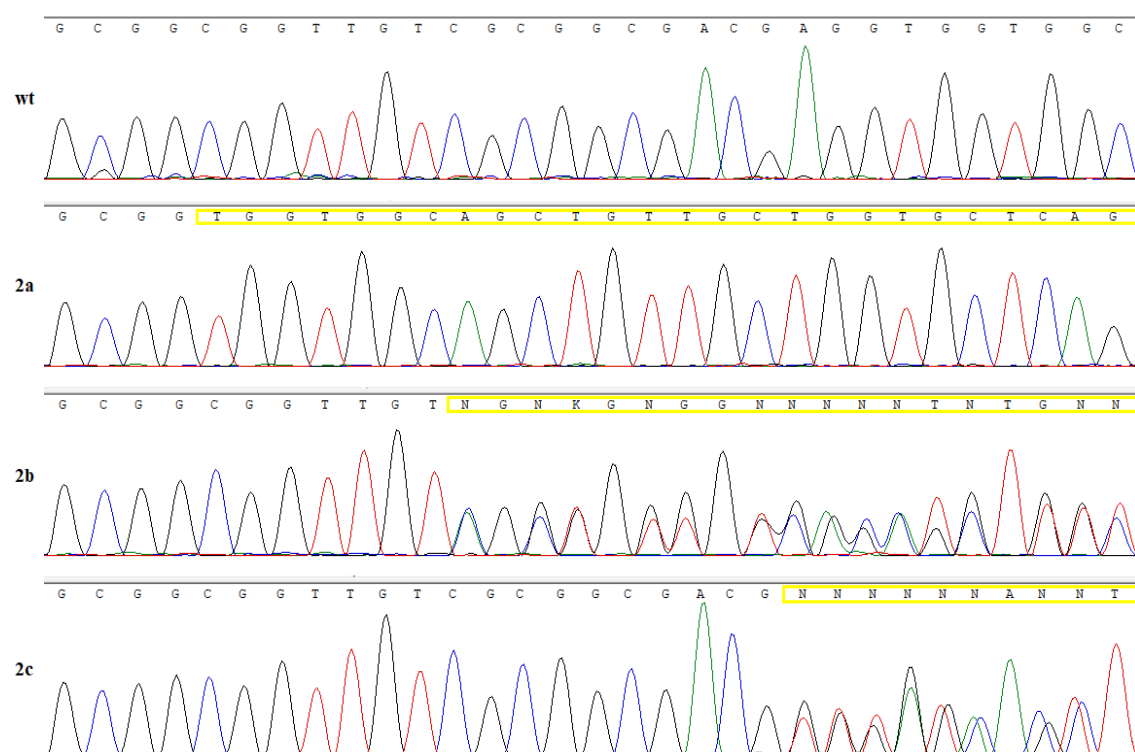
## **4.2 Charakterizace iPSC modelů MPS**

### *4.2.1 Sekvenační analýza transfekovaných iPSC*

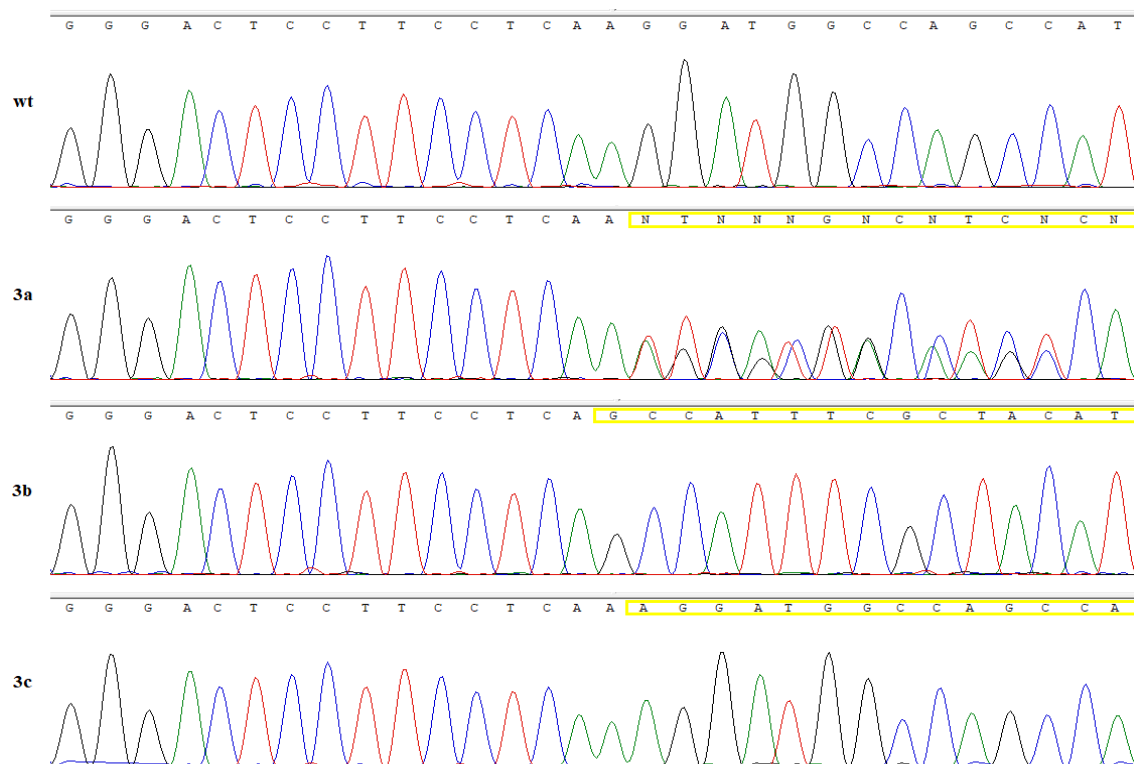
Genomové DNA byly izolovány z kontrolních a transfekovaných iPSC. Pro ověření přítomnosti a určení typu mutace byly cílové oblasti genomu amplifikovány a purifikované produkty PCR byly podrobeny sekvenování. Zároveň byla provedena gelová elektroforéza pro kontrolu čistoty fragmentů a specifity PCR, pomocí délkového markru *HyperLadder 50 bp* byla ověřena správnost délky produktů amplifikace (Tab. 4.4, s. 60 a Obr. 4.8, s. 61).



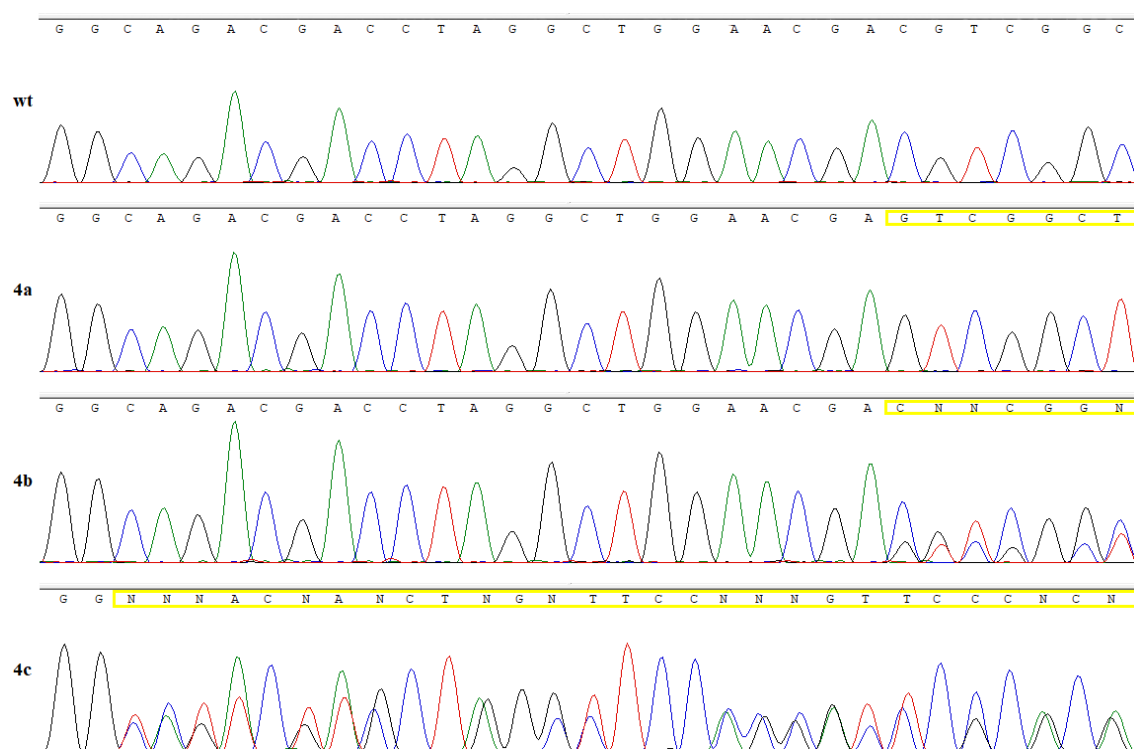
Obr. 4.4 Chromatogramy sekvenovaných fragmentů gDNA transfekovaných (1a, 1b, 1c) a kontrolních (wt) iPSC, které zobrazují oblast genu GNS postiženou mutací (žlutá).



Obr. 4.5 Chromatogramy sekvenovaných fragmentů gDNA transfekovaných (2a, 2b, 2c) a kontrolních (wt) iPSC, které zobrazují oblast genu GALNS postiženou mutací (žlutá).



Obr. 4.6 Chromatogramy sekvenovaných fragmentů gDNA transfekovaných (3a, 3b, 3c) a kontrolních (wt) iPSC, které zobrazují oblast genu *GLB1* postiženou mutací (žlutá).



Obr. 4.7 Chromatogramy sekvenovaných fragmentů gDNA transfekovaných (4a, 4b, 4c) a kontrolních (wt) iPSC, které zobrazují oblast genu *ARSB* postiženou mutací (žlutá).

Tab. 4.4 Přehled editovaných genů, předpokládané délky ampliconů, názvy izolovaných buněčných linií a jim odpovídající mutace jednotlivých alel.

Editovaný gen	Délka ampliconu [bp]	Buněčná linie	Mutace 1. alely	Mutace 2. alely
<i>GNS</i>	450	1a	Inserce 1N	Delece 13 N
		1b	Delece 9 N	Delece 9 N
		1c	-	Delece 9 N
<i>GALNS</i>	333	2a	Delece 20N	Delece 20 N
		2b	Delece 10 N	Delece 8 N
		2c	Delece 4 N	Inserce 74 N
<i>GLB1</i>	368	3a	Inserce 1 N	Delece 14 N
		3b	Delece 10 N	Delece 10 N
		3c	Delece 1 N	Delece 1 N
<i>ARSB</i>	554	4a	Delece 1 N	Delece 1 N
		4b	-	Delece 1 N
		4c	Delece 28 N	Delece 24 N

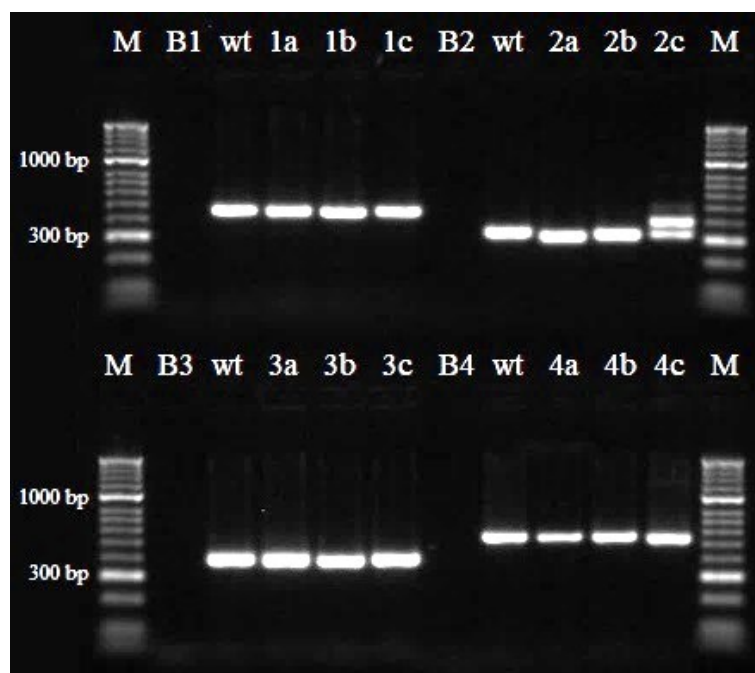
Sekvenační analýza produktů PCR prokázala přítomnost mutací ve všech vzorcích pocházejících od transfekovaných iPSC (Obr. 4.4, Obr. 4.5, Obr. 4.6, Obr. 4.7). Porovnáním sekvencí fragmentů pocházejících od transfekovaných a kontrolních buněk byly identifikovány typy mutací alel jednotlivých linií.

Mutace genu *GNS* proběhla v buněčných liniích **1a**, **1b** a **1c**. V buněčné linii **1a** došlo k inserci 1 nukleotidu v jedné alele a deleci 13 nukleotidů ve druhé alele. V obou případech se jedná o posun čtecího rámce, proto lze předpokládat, že gen *GNS* byl inaktivován. V případě buněčné linie **1b**, která obsahuje deleci 9 nukleotidů v obou alelách, není vliv mutace na funkci genu jednoznačný. V tomto případě nedochází ke změně čtecího rámce, proto výsledná změna sekvence aminokyselin nemusí mít na funkci proteinu vliv. Buněčná linie **1c** obsahuje mutaci pouze jedné alely, mohlo by se jednat o heterozygota, ale vzhledem k charakteru mutace (delece 9 nukleotidů) se nemusí na změně funkce genu nebo výsledného proteinu projevit.

Ve všech izolovaných buněčných liniích s mutací genu *GALNS* (**2a**, **2b**, **2c**) resp. *GLB1* (**3a**, **3b**, **3c**) se změnil počet nukleotidů o číslo nedělitelné třemi v obou alelách, v důsledku toho došlo k posunu čtecího rámce a tím pravděpodobně i k inaktivaci genu *GALNS* resp. *GLB1*.

Mutace genu *ARSB* nastala v buněčných liniích **4a**, **4b** a **4c**. V případě buněčné linie **4a** byla obě vlákna postižena jednonukleotidovou delecí, která způsobuje posun čtecího rámce, a tím i změnu funkce genu *ARSB*. Buněčná linie **4b** obsahuje delecí 1 nukleotidu pouze na jedné alele, jedná se tedy o heterozygota, proto v tomto případě nedochází k úplné inaktivaci genu *ARSB*, protože důsledek mutace je kompenzován zdravou alelou. V případě buněčné linie **4c**, která obsahuje delecí 28 nukleotidů na jedné alele a delecí 24 nukleotidů na druhé alele, není vliv mutace na funkci genu jednoznačný. Delece 24 nukleotidů nezpůsobuje posun čtecího rámce, proto se tato změna sekvence nemusí projevit a může kompenzovat důsledky mutace druhé alely.

Rozdíly v délkách kontrolních fragmentů a fragmentů obsahujících mutaci jsou částečně patrné i z výsledků gelové elektroforézy (Obr. 4.8), kde se nejvíce projevila inserce 74 nukleotidů jedné z alel genu *GALNS* v buněčné linii **2c**. Částečně lze pozorovat i delecí 20 nukleotidů obou alel genu *GALNS* v buněčné linii **2a** nebo delecí 28 nukleotidů a 24 nukleotidů v alelách genu *ARSB* v buněčné linii **4c**.



Obr. 4.8 Gelová elektroforéza produktů amplifikace cílových oblastí genomových DNA kontrolních (wt) a transfekovaných iPSC s editací genu *GNS* (1a-1c), *GALNS* (2a-2c), *GLB1* (3a-3c), *ARSB* (4a-4c) s příslušnými blanky (B1-B4) a délkovým markrem (M).

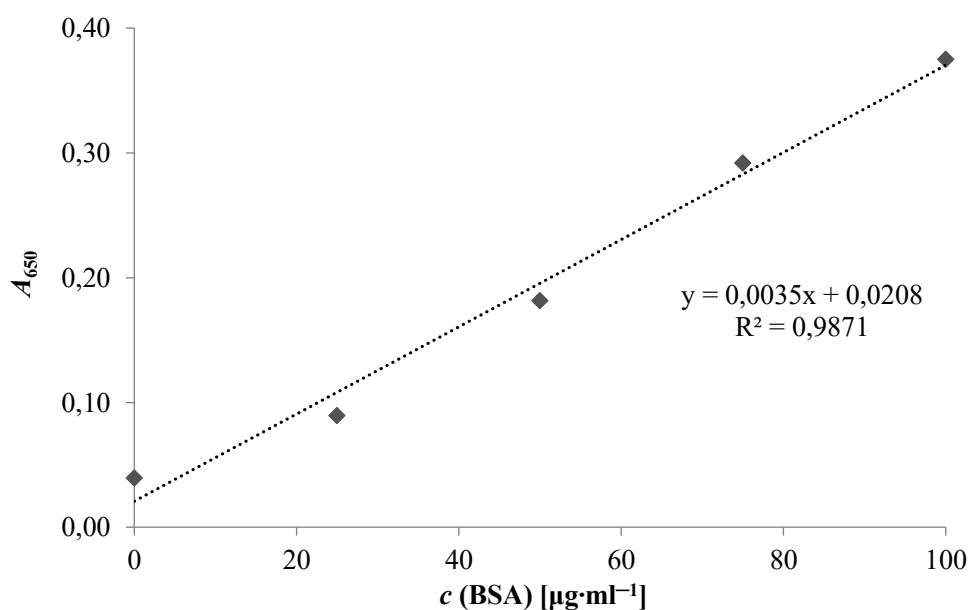
#### 4.2.2 Testování enzymatických aktivit v geneticky modifikovaných iPSC

Modifikovanou Lowryho metodou byl stanoven celkový protein v homogenátech kontrolních iPSC a buněčných liniích obsahujících mutaci genu *GALNS*, *GLB1* nebo *ARSB*. Stanovení celkového proteinu bylo provedeno dvakrát, první měření sloužilo pro přípravu zředěných roztoků homogenátů na požadovanou koncentraci proteinu, při druhém měření byla zjištěna přesná hodnota pracovních roztoků homogenátů, která byla následně využita při výpočtech aktivit příslušných enzymů.

Po inkubaci vzorků s reakčními činidly byla změřena absorbance kalibračních roztoků i zředěných homogenátů při 650 nm. Ze změřených hodnot absorbancí kalibračních roztoků (Tab. 4.5) byla sestavena kalibrační závislost (Obr. 4.9).

Tab. 4.5 Koncentrace BSA v kalibračním roztoku a odpovídající hodnoty absorbance při 650 nm.

$c \text{ (BSA)} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	0	25	50	75	100
$A_{650}$	0,040	0,090	0,182	0,292	0,375



Obr. 4.9 Kalibrační závislost absorbance při 650 nm na koncentraci BSA v roztoku, rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti.

Na základě rovnice kalibrační přímky vycházející z kalibrační závislosti bylo vypočteno množství proteinu ve vzorcích (Tab. 4.6) dle následujícího vzorce:

$$c [\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}] = \frac{A_{650} - 0,0208}{0,0035} \cdot 40,$$

kde  $A_{650}$  je absorbance vzorku při 650 nm.

Tab. 4.6 Výsledky druhého stanovení celkového proteinu v pracovních roztocích homogenátů.

Buněčná linie	$A_{650}$	$c$ (protein) [ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ]
Kontrolní	0,230	2,99
2a	0,265	1,99
2b	0,300	2,28
2c	0,273	2,06
3a	0,203	0,0521
3b	0,229	0,0595
3c	0,184	0,0466
4a	0,248	3,25
4b	0,229	2,97
4c	0,234	3,05

Po stanovení celkového proteinu ve všech homogenátech zředěných na požadované koncentrační hladiny bylo provedeno testování aktivity kontrolního enzymu a následně postiženého enzymu.

Stanovení celkového proteinu ani testování enzymatické aktivity buněčných linií obsahujících mutaci genu *GNS* nebylo provedeno, protože metoda testování aktivity *N*-acetyl-glukosamin-6-sulfatasy není na našem pracovišti zatím dostupná.

Aktivita  $\beta$ -galaktosidasy, jako kontrolního enzymu, byla otestována ve všech zředěných homogenátech s výjimkou vzorků pocházejících z buněčných linií **3a**, **3b** a **3c**. Tyto linie obsahují mutaci genu *GLBI*, která může mít dopad na aktivitu  $\beta$ -galaktosidasy, proto byl v tomto případě zvolen jako kontrolní enzym  $\beta$ -hexosaminidasa. Ve vzorku kontrolní buněčné linie byla změřena aktivita všech testovaných enzymů a výsledné hodnoty sloužily jako referenční.

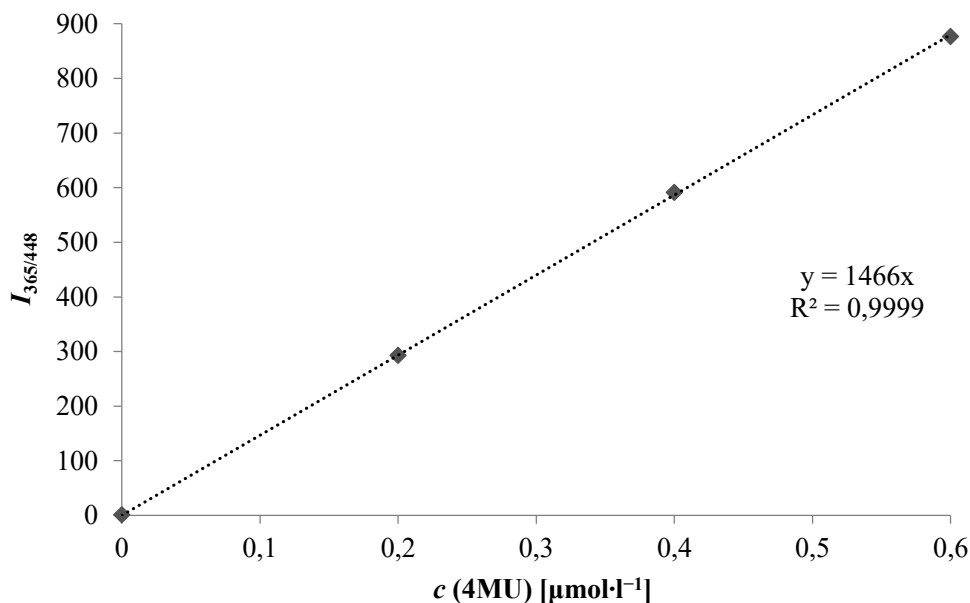
Tyto enzymy byly zvoleny jako kontrolní, protože postup není časově ani finančně náročný a klade nízké nároky na množství vzorku.

Ve všech zředěných homogenátech byla změřena intensita fluorescence uvolněného 4MU při 365/488 nm (ex/em). Pro výpočet množství uvolněného 4MU

působením  $\beta$ -hexosaminidasy a  $\beta$ -galaktosidasy byla použita stejná kalibrační závislost (Obr. 4.10).

Tab. 4.7 Koncentrace 4MU v kalibračním roztoku a odpovídající intenzita fluorescence při 365/448 nm (ex/em).

$c$ (4MU) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	0	0,2	0,4	0,6
$I_{365/448}$	1,029	292,978	591,319	876,394



Obr. 4.10 Kalibrační závislost intenzity fluorescence při 365/488 nm (ex/em) na koncentraci 4MU ve vzorku, rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti.

Z rovnice kalibrační přímky a intenzity fluorescence vzorků při 365/448 nm byla získána koncentrace uvolněného 4MU a následně vypočtena aktivita  $\beta$ -hexosaminidasy (Tab. 4.8), resp.  $\beta$ -galaktosidasy (Tab. 4.9) dle následujících vzorců:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{(c_{vz} - 0,01621) \cdot 2,56}{m},$$

resp.

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{(c_{vz} - 0,02072) \cdot 1,28}{m},$$

kde  $c_{vz}$  je koncentrace 4MU ve vzorku ( $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a  $m$  je množství proteinu v reakci (mg).



Tab. 4.8 Výsledky testování aktivity  $\beta$ -hexosaminidasy (HEXB).

Vzorek	$I_{365/448}$	$c$ (4MU) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$m$ (protein) [ $\mu\text{g}$ ]	$A$ (HEXB) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]
Blank	23,77	0,01621	-	-
Kontrola	442,0	0,3015	0,399	1,83
3a	569,8	0,3887	0,417	2,29
3b	422,9	0,2885	0,476	1,47
3c	456,3	0,3133	0,373	2,04

Tab. 4.9 Výsledky testování aktivity  $\beta$ -galaktosidasy (GLB1).

Vzorek	$I_{365/448}$	$c$ (4MU) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]	$m$ (protein) [ $\mu\text{g}$ ]	$A$ (GLB1) [ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]
Blank	30,37	0,02072	-	-
Kontrola	299,4	0,2042	0,996	236
2a	337,2	0,2300	0,997	269
2b	315,4	0,2151	1,14	218
2c	448,4	0,3059	1,03	355
3a	37,64	0,0257	1,04	6,10
3b	35,30	0,0241	1,19	3,62
3c	35,66	0,0243	0,933	4,96
4a	595,9	0,4065	1,08	456
4b	376,4	0,2567	0,991	305
4c	387,2	0,2641	1,02	307

Pro hodnocení vlivu mutace genu *GLB1* v buněčných liniích **3a**, **3b**, **3c** byla aktivita  $\beta$ -galaktosidasy vztažena na aktivitu  $\beta$ -hexosaminidasy, která není touto mutací postižena (Tab. 4.10). Výsledné hodnoty byly porovnány s podílem aktivit příslušných enzymů kontrolní buněčné linie, který byl přepočten na 100 %.

Tab. 4.10 Aktivita kontrolního enzymu (HEXB) a postiženého enzymu (GLB1) buněčných linií s mutací genu *GLB1* (3a, 3b, 3c) a kontrolních iPSC.

Buněčná linie	A (HEXB) [ $\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	A (GLB1) [ $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	A (GLB1)/A (HEXB) [%]
Kontrola	1,83	236	100
3a	2,29	6,10	2,07
3b	1,47	3,62	1,91
3c	2,04	4,96	1,89

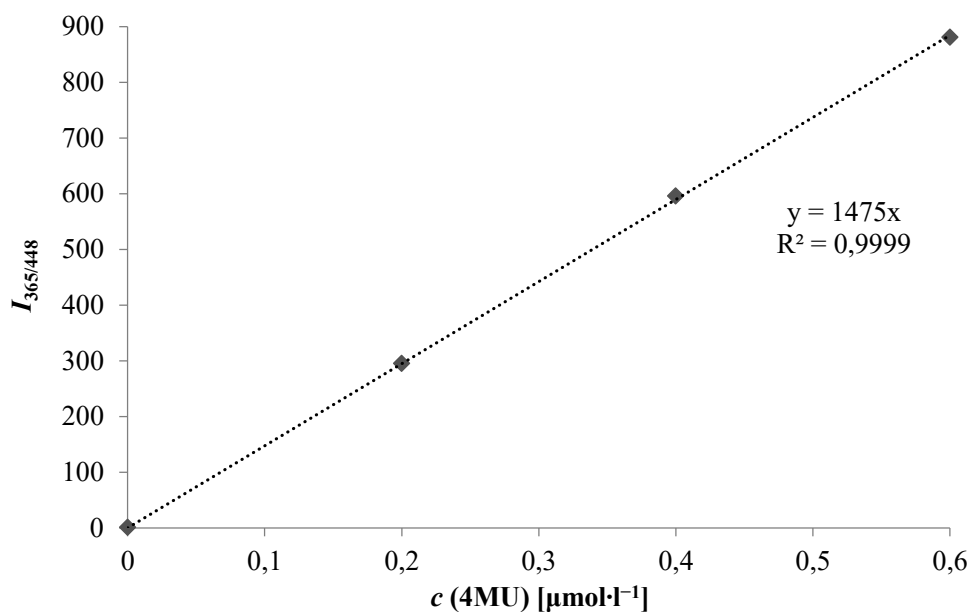
Z podílu aktivit postiženého a kontrolního enzymu vyplývá, že došlo k poklesu aktivity  $\beta$ -galaktosidasy ve všech buněčných liniích s mutací genu *GLB1* až padesátkrát. Ve všech takto postižených buňkách došlo vlivem mutace k posunu čtecího rámce, který má za následek deficit enzymu  $\beta$ -galaktosidasy. Lze tedy říci, že buněčné linie **3a**, **3b** i **3c** představují *knock-out* buněčné modely MPS IVB.

U vzorků pocházejících z buněčných linií **2a**, **2b** a **2c** obsahující mutaci *GALNS* a kontrolních iPSC byla dále testována aktivita *N*-Acetylgalactosamin-6-sulfát sulfatasy. Po ukončení reakce byla změřena intensita fluorescence při 365/488 nm (ex/em) ve vzorcích homogenátů i kalibračních roztoků (Tab. 4.11).

Tab. 4.11 Koncentrace 4MU v kalibračním roztoku a odpovídající intensita fluorescence při 365/448 nm (ex/em).

<b>c (4MU) [<math>\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}</math>]</b>	0	0,2	0,4	0,6
<b><math>I_{365/448}</math></b>	0,963	295,005	596,088	880,894

Koncentrace 4MU uvolněného působením *N*-Acetylgalactosamin-6-sulfát sulfatasy ve vzorcích byla vypočtena dosazením intenzit fluorescence při 365/448 nm (ex/em) do rovnice kalibrační přímky příslušné kalibrační závislosti (Obr. 4.11).



Obr. 4.11 Kalibrační závislost intensity fluorescence při 365/448 nm (ex/em) na koncentraci 4MU, rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti.

Aktivita *N*-Acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy byla vypočtena ze získaných hodnot koncentrací 4MU (Tab. 4.12) dle následujícího vzorce:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{(c_{\text{vz}} - 4,489) \cdot 0,0378}{m},$$

kde  $c_{\text{vz}}$  je koncentrace 4MU ve vzorku ( $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ ) a  $m$  je množství celkového proteinu v reakci (mg).

Tab. 4.12 Výsledky testování aktivity *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy (GALNS).

Vzorek	$I_{365/448}$	$c$ (4MU) [nmol·l <sup>-1</sup> ]	$m$ (protein) [μg]	$A$ (GALNS) [nmol·g <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]
Blank	6,622	4,489	-	-
Kontrola	528,7	358,5	19,9	671
2a	7,183	4,869	19,9	0,720
2b	7,549	5,118	22,8	1,04
2c	7,367	4,994	20,6	0,926

Obdobně jako v předchozím případě byla aktivita *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy buněčných linií s mutací genu *GALNS* (**2a**, **2b**, **2c**) vztažena na aktivitu kontrolního enzymu  $\beta$ -galaktosidasy (Tab. 4.13). Výsledné podíly byly porovnány s referenční hodnotou kontrolních iPSC.

Tab. 4.13 Aktivita kontrolního enzymu (GLB1) a postiženého enzymu (GALNS) buněčných linií s mutací genu GALNS (2a, 2b, 2c) a kontrolních iPSC.

Buněčná linie	A (GLB1) [nmol·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	A (GALNS) [nmol·g <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	A (GALNS)/A (GLB1) [%]
Kontrola	236	671	100
2a	269	0,720	0,0856
2b	218	1,04	0,168
2c	355	0,926	0,0917

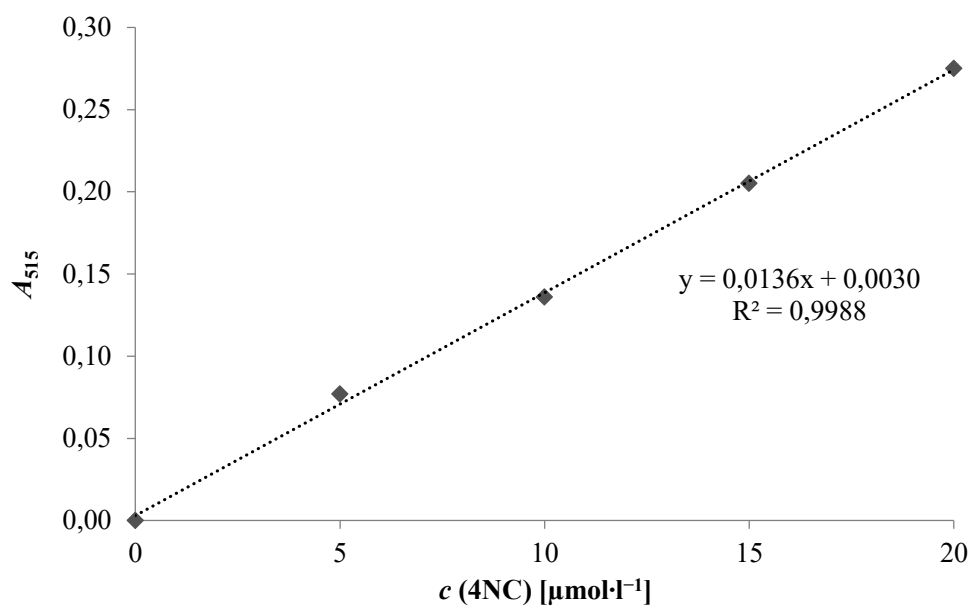
Porovnáním hodnot podílů aktivit postiženého a kontrolního enzymu je zřejmé, že mutace genu *GALNS* přítomná v buněčných liniích **2a**, **2b** a **2c**, způsobila výrazný pokles aktivity *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy. Ve všech případech došlo vlivem mutací ke změně čtecího rámce, která vedla k deficitu příslušného enzymu. Buněčné linie **2a**, **2b** a **2c** lze považovat za *knock-out* buněčné modely MPS IVA.

U vzorků pocházejících z buněčných linií **4a**, **4b** a **4c** obsahující mutaci *ARSB* a kontrolních iPSC byla testována aktivita arylsulfatasy B. Po ukončení reakce byla změřena absorbance při 515 nm ve vzorcích homogenátů i kalibračních roztoků 4NC (Tab. 4.14).

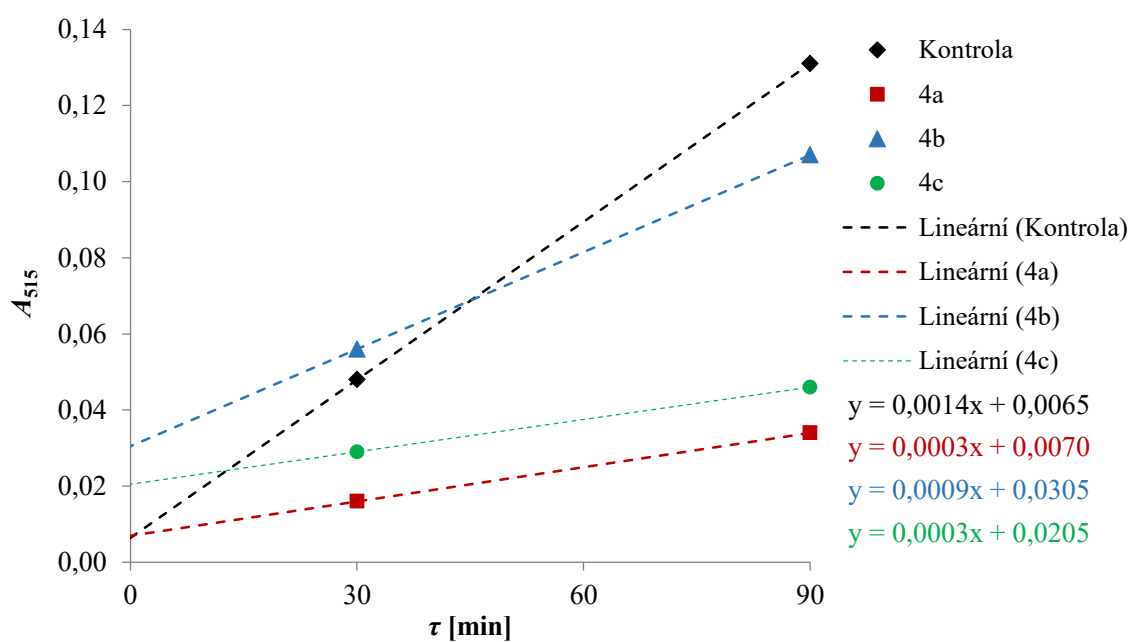
Tab. 4.14 Koncentrace 4NC v kalibračním roztoku a odpovídající hodnota absorbance při 515 nm.

c (4NC) [μmol·l <sup>-1</sup> ]	0	5	10	15	20
A <sub>515</sub>	0,000	0,077	0,136	0,205	0,275

Z výsledků měření byla sestrojena kalibrační závislost absorbance kalibračních roztoků při 515 nm na koncentraci 4NC (Obr. 4.12) a závislost absorbance vzorků homogenátů při 515 nm na reakčním čase (Obr. 4.13).



Obr. 4.12 Kalibrační závislost absorbanci při 515 nm na koncentraci 4NC v roztoku, rovnice kalibrační závislosti a hodnota spolehlivosti.



Obr. 4.13 Závislost absorbance při 515 nm na reakčním čase ve vzorcích homogenátů a odpovídající rovnice přímek.

Aktivita arylsulfatasy B ve vzorcích (Tab. 4.15) byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$A [\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{\left( \frac{(A^{90} - A^{60}) - 0,2 K}{0,0136} \right) - 0,0030}{m},$$

kde  $A^{90} - A^{60}$  je rozdíl absorbancí 4NC,  $m$  je množství proteinu (mg) a  $K$  je úsek na ose  $y$  ze závislosti absorbance ( $A_{515}$ ) na době inkubace.

Tab. 4.15 Výsledky testování aktivity arylsulfatasy B (ARSB).

Vzorek	$A_{515} (t_0)$	$A_{515} (t_{30})$	$A_{515} (t_{90})$	$K \cdot 10^{-3}$	$m$ (protein) [mg]	$A$ (ARSB) [nmol·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]
Ctrl	0,020	0,068	0,151	6,50	0,149	39,6
4a	0,023	0,039	0,057	7,00	0,162	7,41
4b	0,026	0,082	0,133	30,5	0,149	21,9
4c	0,021	0,050	0,067	20,5	0,152	6,14

Aktivita arylsulfatasy B buněčných linií s mutací genu *ARSB* (**4a**, **4b**, **4c**) byla vztažena na aktivitu kontrolního enzymu  $\beta$ -galaktosidasy (Tab. 4.16). Výsledné podíly byly porovnány s referenční hodnotou kontrolních iPSC.

Tab. 4.16 Aktivita kontrolního enzymu (GLB1) a postiženého enzymu (ARSB) buněčných linií s mutací genu *ARSB* (4a, 4b, 4c) a kontrolních iPSC.

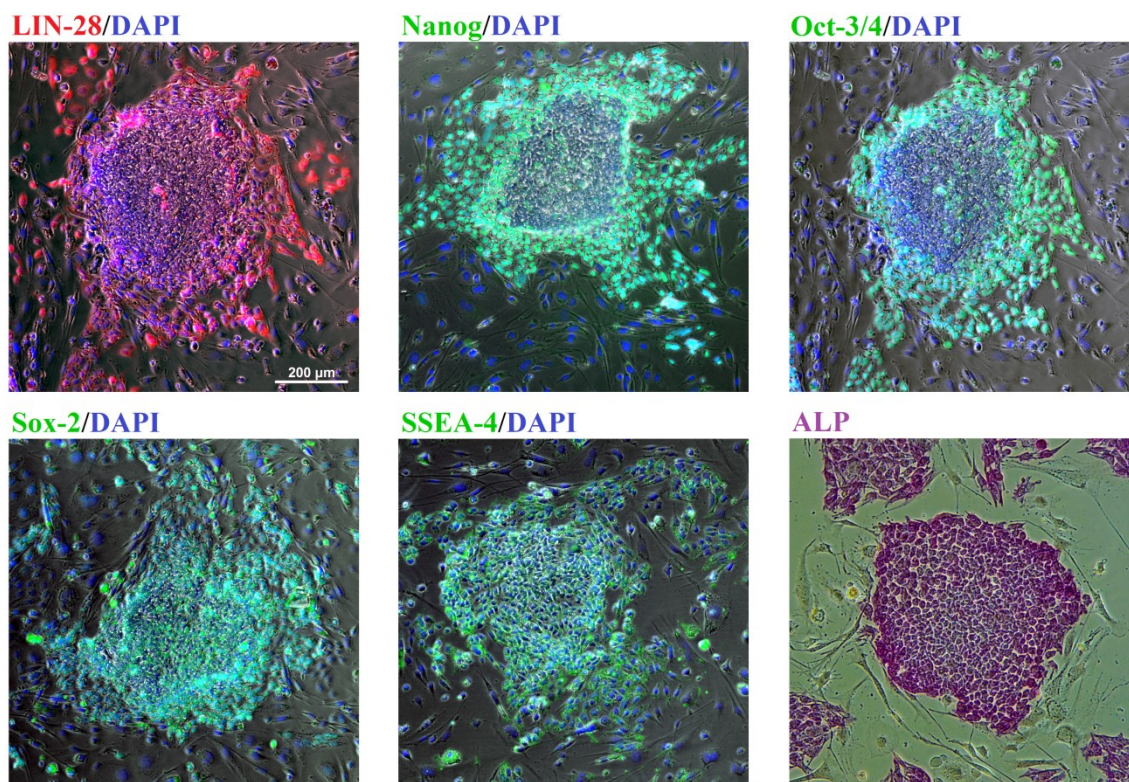
Buněčná linie	$A$ (GLB1) [nmol·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	$A$ (ARSB) [nmol·mg <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	$A$ (ARSB)/ $A$ (GLB1) [%]
Kontrola	236	39,6	100
4a	456	7,41	9,68
4b	305	21,9	42,8
4c	307	6,14	11,9

Z podílů aktivit postiženého a kontrolního enzymu, lze vypočítat vliv mutací genu *ARSB* na aktivitu arylsulfatasy B. V případě buněčné linie **4a** došlo k poklesu aktivity desetkrát oproti kontrolním iPSC vlivem mutace obou alel způsobující posun čtecího rámce. Buněčná linie **4b** obsahuje jednonukleotidovou delecii pouze jedné alely, čemuž odpovídá pokles aktivity o více než polovinu, jedná se tedy o heterozygota. Buněčná linie **4c** obsahuje mutaci obou alel, ale v jednom případě se jedná o delecii 24 nukleotidů, nedochází tedy k posunu čtecího rámce, ale dopad na aktivitu arylsulfasy B je srovnatelný s vlivem mutací přítomné v linii **4a**.

#### 4.2.3 Detekce exprese znaků pluripotence v geneticky modifikovaných iPSC

Na základě výsledků enzymatické aktivity a rozpoznaných mutací byly vybrány buněčné linie **1a**, **2b**, **3b** a **4a** pro další experimenty.

U vybraných buněčných modelů bylo ověřeno zachování stavu pluripotence porovnáním morfologie s kontrolními iPSC, imunofluorescenčním barvením zvolených znaků pluripotence (LIN-28, Nanog, Oct-3/4, SSEA-4, Sox-2) a barvením demonstrujícím aktivitu alkalické fosfatasy (Obr. 4.14).



Obr. 4.14 Ukázka výsledků barvení znaků pluripotence v některých transfekovaných buněčných liniích zobrazující produkci LIN-28 (červená), Nanog, Oct-3/4, Sox-2, SSEA-4 (zelená) a ALP (fialová). Všechna buněčná jádra jsou vizualizována pomocí DAPI (modrá). Měřítko označuje 200 µm.

LIN-28 se řadí do skupiny proteinů vázajících se na mRNA, je lokalizován v cytoplasmě a slouží jako post-translační faktor. Proteiny Nanog, Oct-3/4 a Sox-2 patří mezi transkripční faktory vázající se na DNA a jsou lokalizovány v jádře. Tyto znaky zajišťují udržení stavu pluripotence regulací sebeobnovy, proliferace i vývoje a brání diferenciaci. Společně s povrchovým glykolipidem SSEA-4 a alkalickou fosfatase demonstrují stav pluripotence a diferenciací jejich exprese klesá.



Barvení uvedených znaků pluripotence prokázala srovnatelnou míru jejich exprese v transfekovaných buněčných liniích v porovnání s kontrolními iPSC. Stav pluripotence byl tedy zachován navzdory transfekce a následujícím operacím. Buněčné linie **1a**, **2b**, **3b** a **4a** představují iPSC modely vybraných mukopolysacharidos.

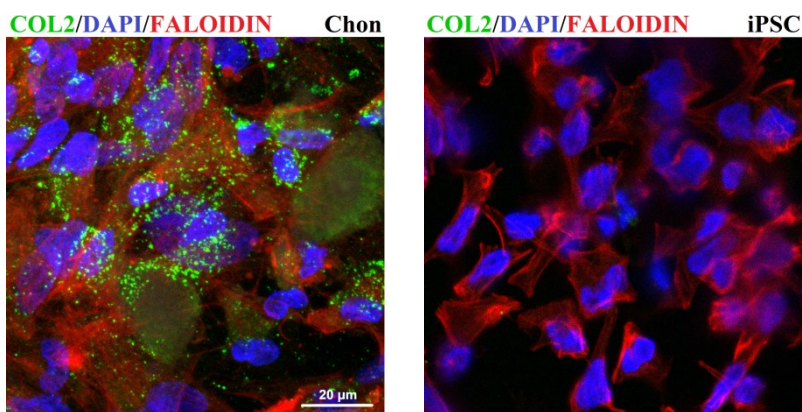
### 4.3 Charakterizace buněčných modelů MPS odvozených od iPSC

#### 4.3.1 Imunofluorescence kolagenu II, heparan sulfátu a chondroitin sulfátu v buněčných modelech MPS

Vybrané iPSC modely byly podrobeny chondrogenní diferenciaci. Buňky byly udržovány 30 dní po skončení diferenciaci ve standardním chondrogenním mediu pro prohloubení fenotypu a pro případné strádání glykosaminoglykanů.

Chondrocyty patří mezi buňky mesodermálního zárodečného listu a představují základní stavební jednotku chrupavek. Kromě kolagenů produkují chondrocyty velké množství proteoglykanů, resp. glykosaminoglykanů, proto patří mezi typy buněk, které mukopolysacharidosy postihují.

Úspěšnost diferenciaci byla ověřena porovnáním morfologie s iPSC a imunofluorescencí kolagenu II (Obr. 4.15), který tento typ buněk produkuje ve zvýšené míře, a proto je považován za typický znak chondrocytů.

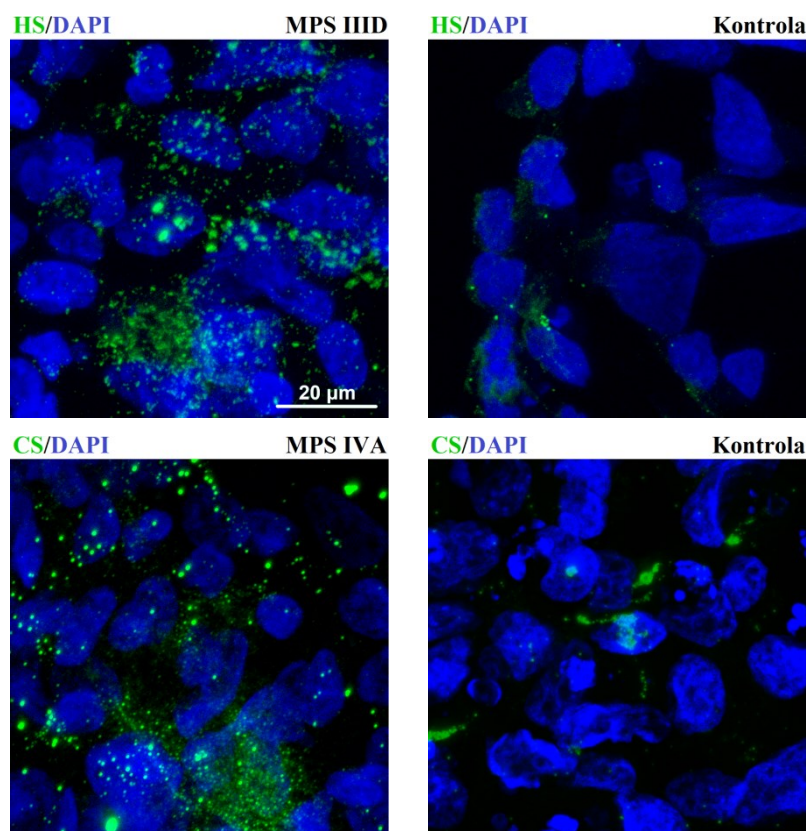


Obr. 4.15 Ukázka výsledků imunofluorescence znaku chondrocytů v diferencovaných buňkách a kontrolních iPSC zobrazující produkci kolagenu II (zelená). Jádra jsou vizualizovaná DAPI (modrá) a cytoskelet faloidinem (červená). Měřítka označuje 20 μm.



Imunofluorescence prokázala výrazně vyšší produkci kolagenu II v diferencovaných buňkách oproti iPSC. Nicméně, chondrogenní diferenciace neproběhla u 100 % diferencovaných buněk, protože v některých oblastech nebyl kolagen II detekován. Tyto buňky se pravděpodobně nedostaly do konečného stádia diferenciace, ale dle jejich morfologie se nejedná o iPSC. Pro zhodnocení celkového výsledku chondrogenní diferenciace by bylo potřeba provést další experimenty, například imunofluorescence dalších znaků chondrocytů nebo detekce míry jejich exprese s použitím rtPCR.

Imunofluorescence heparan sulfátu a chondroitin sulfátu v diferencovaných buňkách (Obr. 4.16) byla provedena 30 dní po skončení diferenciačního protokolu pro porovnání množství glykosaminoglykanů v izogenních párech.



Obr. 4.16 Ukázka výsledků imunofluorescence glykosaminoglykanů heparan sulfátu resp. chondroitin sulfátu (zelená) v diferencovaných buněčných modelech MPS IIID resp. MPS IVA a diferencované kontrole. Buněčná jádra jsou vizualizována DAPI (modrá). Měřítko označuje 20 µm.

Výsledky imunofluorescenčního barvení heparan sulfátu a chondroitin sulfátu prokázaly mírně zvýšené množství těchto glykosaminoglykanů v diferencovaných

buňkách postižených mutací. Převládajícím glykosaminoglykanem v chondrocytech je chondroitin sulfát, proto v důsledku mutace genu *GALNS* dochází k jeho akumulaci v diferencovaném buněčném modelu MPS IVA. Heparan sulfát je ve velké míře produkován tímto buněčným typem především ve fázi chondrogenese a při formování chrupavky. Zvýšené množství tohoto glykosaminoglykanu bylo detekováno především v buněčném modelu MPS IIID, kde je akumulován v důsledku mutace genu *GNS*.

Podobně jako v případě imunofluorescence kolagenu II byla patrná heterogenita výskytu heparan sulfátu resp. chondroitin sulfátu, která souvisí s neúplnou chondrogenézí v populaci buněk, protože ke strádání glykosaminoglykanů dochází spíše v diferencovaných buňkách díky jejich postmitotickému charakteru a vyšší expresy glykosaminoglykanů.

#### 4.3.2 Stanovení glykosaminoglykanů v buněčných modelech MPS

Pro určení celkového množství glykosaminoglykanů ve formě proteoglykanů v diferencovaných modelech a příslušných iPSC bylo provedeno jejich fotometrické stanovení po 30 dnech od konce diferenciačního protokolu.

Nejprve byl stanoven Bradfordovou metodou celkový protein v homogenátech diferencovaných kontrolních buněk, diferencovaných buněčných modelech a jejich nediferencovaných ekvivalentech. Stanovení celkové proteinu bylo provedeno dvakrát, výsledky prvního měření byly využity pro zředění vzorků na podobnou hodnotu koncentrace proteinu. Při druhém měření byla zjištěna přesná koncentrace proteinu v pracovních roztocích.

Po inkubaci zředěných homogenátů s reakčním činidlem byla změřena jejich absorbance při 595 nm. Ze získaných absorbancí kalibračních roztoků BSA (Tab. 4.17) byla sestavena kalibrační závislost (Obr. 4.17).

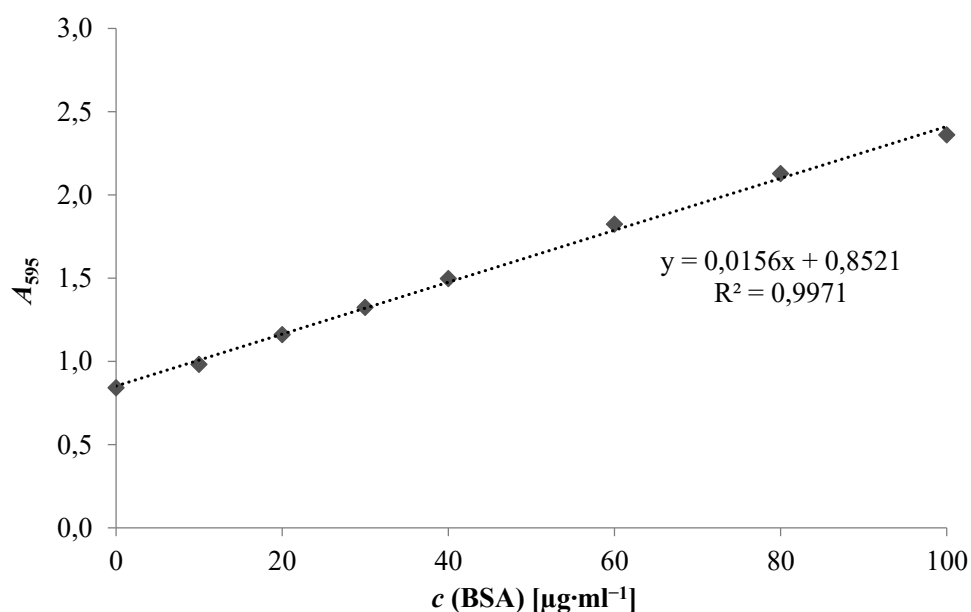
Tab. 4.17 Koncentrace BSA v kalibračním roztoku a odpovídající hodnota absorbance při 595 nm.

$c \text{ (BSA)} [\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}]$	0	10	20	30	40	60	80	100
$A_{595}$	0,841	0,983	1,161	1,324	1,498	1,825	2,128	2,361

Dle rovnice kalibrační přímky vycházející z kalibrační závislosti byla vypočtena koncentrace celkového proteinu ve vzorcích (Tab. 4.18) dle následujícího vzorce:

$$c [\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}] = \frac{A_{595} - 0,8521}{0,0156} \cdot 50,$$

kde  $A_{595}$  je absorbance vzorku při 595 nm.



Obr. 4.17 Kalibrační závislost absorbance při 595 nm na koncentraci BSA v roztoku, rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti.

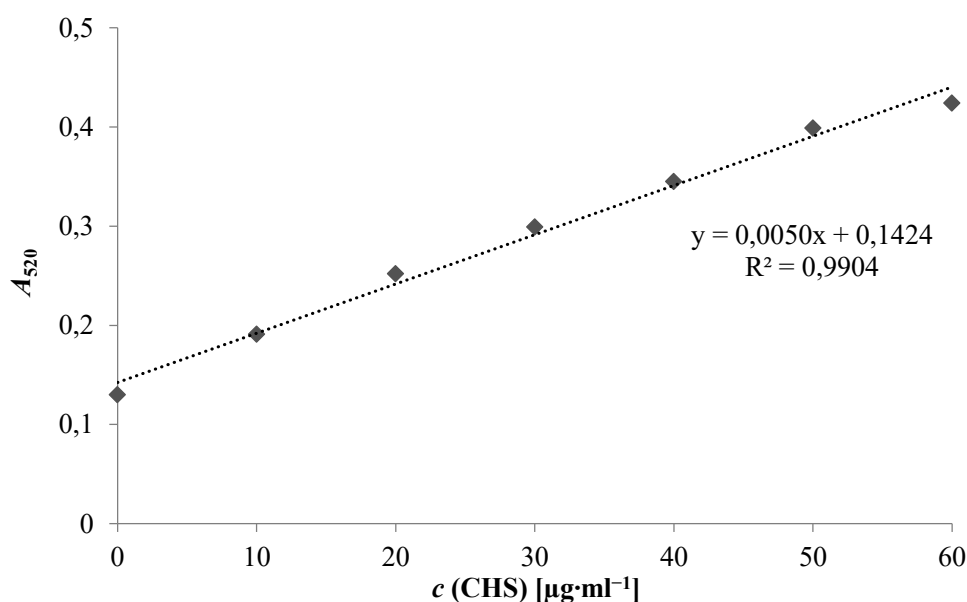
Tab. 4.18 Výsledky druhého stanovení celkového proteinu v pracovních roztocích homogenátů.

Typ buněk	Buněčná linie	$A_{595}$	$c$ (protein) [ $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ]
iPSC	Kontrolní	2,096	3,99
	1a	2,480	5,22
	2b	2,467	5,18
	3b	2,222	4,39
	4a	2,412	5,00
Chondrocyty	Kontrolní	2,145	4,14
	1a	1,633	2,50
	2b	2,076	3,92
	3b	2,234	4,43
	4a	1,800	3,04

Poté bylo provedeno stanovení glykosaminoglykanů v pracovních roztocích všech homogenátů. Po inkubaci vzorků s reakčními roztoky byla změřena jejich absorbance při 520 nm. Z výsledků měření kalibračních roztoků CHS (Tab. 4.19) byla sestavena kalibrační závislost (Obr. 4.18).

Tab. 4.19 Koncentrace CHS v kalibračním roztoku a odpovídající hodnota absorbance při 520 nm.

<b><math>c</math> (CHS) [<math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>]</b>	0	10	20	30	40	50	60
<b><math>A_{520}</math></b>	0,130	0,191	0,252	0,299	0,345	0,399	0,424



Obr. 4.18 Kalibrační závislost absorbance při 520 nm na koncentraci CHS v roztoku, rovnice kalibrační přímky a hodnota spolehlivosti.

Množství glykosaminoglykanů ve vzorcích (Tab. 4.20) bylo vypočteno dosazením absorbance při 520 nm do rovnice kalibrační přímky, výsledná hodnota byla vztažena na množství proteinu ve vzorku:

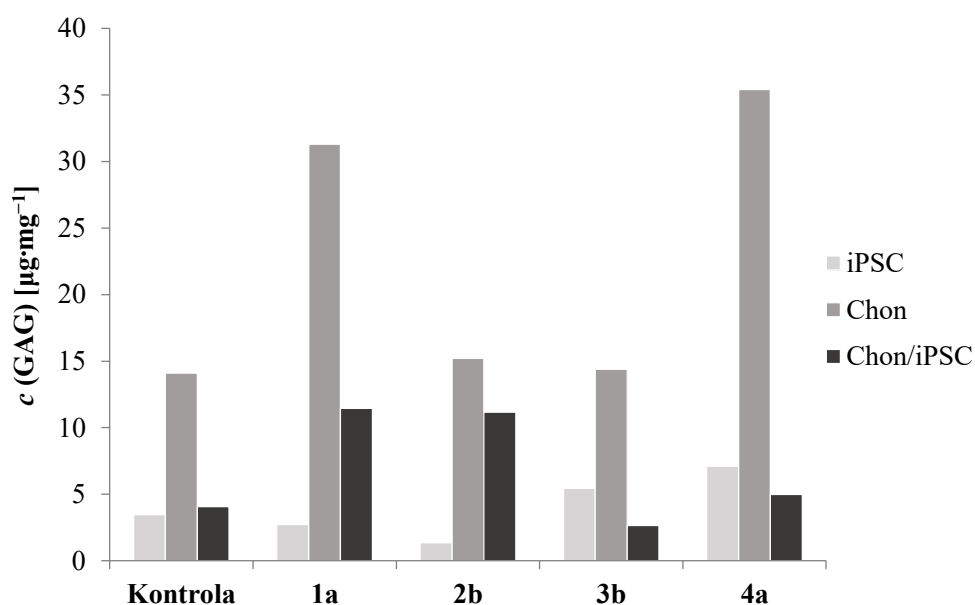
$$c [\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}] = \frac{(A_{520} - 0,1424) \cdot 0,020}{0,0050 \cdot m},$$

kde  $A_{520}$  je absorbance vzorku při 520 nm a  $m$  je množství proteinu ve vzorku (mg).

Množství glykosaminoglykanů v transfekovaných a kontrolních buněčných liniích bylo porovnáno v rámci buněčného typu. Pro určení vlivu diferenciací a typu MPS na akumulaci glykosaminoglykanů bylo jejich množství v chondrocytech vztaženo na množství v iPSC (Obr. 4.19).

Tab. 4.20 Výsledky fotometrického stanovení glykosaminoglykanů.

Typ buněk	Buněčná linie	$A_{520}$	$c$ (GAG) [ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ]	$c$ (protein) [ $\mu\text{g}$ ]	$c$ (GAG) [ $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ ]
iPSC	Kontrolní	0,177	13,8	39,9	3,47
	1a	0,178	14,2	52,2	2,73
	2b	0,160	7,04	51,8	1,36
	3b	0,202	23,8	43,9	5,43
	4a	0,231	35,4	50,0	7,09
Chondrocyty	Kontrolní	0,288	58,2	41,4	14,1
	1a	0,338	78,2	25,0	31,3
	2b	0,291	59,4	39,2	15,2
	3b	0,302	63,8	44,3	14,4
	4a	0,411	107	30,4	35,4



Obr. 4.19 Obsah glykosaminoglykanů v kontrolních buňkách a buněčných liniích s mutací genu *GNS* (1a), *GALNS* (2b), *GLB1* (3b) resp. *ARSB* (4a) v závislosti na buněčném typu a míra akumulace glykosaminoglykanů v chondrocytech oproti iPSC.

Z výsledků fotometrického stanovení glykosaminoglykanů v buněčných homogenátech je patrné, že chondrocyty obsahují více glykosaminoglykanů než iPSC.

V nediferencovaných buněčných liniích **3b** a **4a** bylo detekováno větší množství GAG oproti kontrolním iPSC, důsledek mutace genů *GLBI* a *ARSB* se částečně projevil již v pluripotentním stavu.

K největšímu nárůstu glykosaminoglykanů v chondrocytech oproti iPSC došlo v buněčných liniích **1a** a **2b**. Mutace genu *GNS* se projevuje akumulací heparan sulfátu, který je buňkami produkován především ve stádiu chondrogenese. V případě mutace genu *GALNS* dochází k akumulaci chondroitin sulfátu, který v tomto buněčném typu dominuje, ale také keratan sulfátu. V buněčných liniích **3b** resp. **4a** je nárůst glykosaminoglykanů v chondrocytech oproti iPSC srovnatelný s kontrolními iPSC, protože vliv mutace genu *GLBI* resp. *ARSB* na snížení degradace keratan sulfátu resp. dermatan sulfátu se v chondrocytech projevuje méně.

## 5 ZÁVĚR

Kombinací systému CRISPR/Cas9 a iPSC technologie byly vytvořeny lidské buněčné modely mukopolysacharidos IIID, IVA, IVB a VI inaktivací genu *GNS*, *GALNS*, *GLBI* resp. *ARSB*. Jedná se tak o první přípravu buněčných modelů těchto mukopolysacharidos založených na lidských indukovaných pluripotentních kmenových buňkách.

Insercí navržených oligonukleotidů do vektoru byly připraveny plasmidy umožňující mj. produkci Cas9 endonukleasy a příslušných gRNA v cílových buňkách. Připravené plasmidy byly dopraveny do indukovaných pluripotentních kmenových buněk elektroporací, jejíž účinnost byla nejprve ověřena prostřednictvím transfekce plasmidu exprimujícího GFP a následnou průtokovou cytometrií.

Úspěšnost navrženého systému CRISPR/Cas9 a transfekce do iPSC byla ověřena Sangerovou sekvenační metodou cílových fragmentů gDNA izolovaných klonů. Sekvenování prokázalo přítomnost mutací cílových genů v izolovaných klonech, kde došlo převážně k delecí nebo insercí malého počtu nukleotidů nedělitelného třemi v obou alelách, v extrémním případě nastala inserce 74 nukleotidů. Jedna testovaná buněčná linie měla charakter heterozygota.

Dle typu mutací byl odhadnut jejich vliv na funkce postižených genů a souvisejících enzymů, který byl ověřen testováním enzymatických aktivit.

Deficit enzymů  $\beta$ -galaktosidasy, *N*-acetylgalaktosamin-6-sulfát sulfatasy a arylsulfatasy B v transfekovaných buněčných liniích obsahujících mutaci genů *GALNS*, *GLBI* a *ARSB* potvrdil výsledky sekvenování a prokázal, že navržený systém CRISPR/Cas9 způsobil inaktivaci cílových genů v několika izolovaných klonech.

V transfekovaných klonech, vybraných na základě výsledků sekvenování a enzymatických aktivit, bylo potvrzeno zachování stavu pluripotence porovnáním morfologie a výsledků detekce exprese znaků pluripotence s kontrolními iPSC.

Pro porovnání fenotypu jednotlivých buněčných modelů byly vybrané izolované klony podrobeny chondrogenní diferenciaci. Úspěšnost diferenciaci byla potvrzena imunofluorescencí kolagenu II, který je typickým znakem chondrocytů, a porovnáním morfologie s iPSC.

Množství glykosaminoglykanů akumulovaných v důsledku inaktivace příslušných genů v diferencovaných buňkách bylo detekováno imunofluorescenčně a fotometricky.

V diferencovaných buňkách představující modely MPS IIID resp. MPS IVA dochází k nejvyššímu nárůstu glykosaminoglykanů v důsledku akumulace heparan sulfátu resp. chondroitin sulfátu a keratan sulfátu.

Pro definitivní potvrzení vlivu inaktivace genů *GNS*, *GALNS*, *GLBI* a *ARSB* na akumulaci glykosaminoglykanů v chondrocytech je potřeba sledovat jejich nárůst v delším časovém úseku vůči kontrolním liniím.

Připravené iPSC modely mohou být diferencovány na jiné buněčné typy (např. neurony), které jsou relevantní pro studovanou skupinu onemocnění a využity pro studium patogeneze specifického tkáňového poškození. Tyto modely mají také potenciál pro testování účinnosti různých terapeutických přístupů.



## 6 SEZNAM ZDROJŮ

1. Micsenyi, C., M. & Walkley, U., S. The Lysosomal System: Physiology and Pathology. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide* (eds. Mehta, A. & Winchester, B.) 3–12 (Wiley-Blackwell, 2012).
2. Elleder, M., Sikora, J., Ledvinová, J., Poňka, P. & Mělková, Z. Patologie buňky - vybrané kapitoly. *Portál I. lékařské fakulty University Karlovy* [online], Dostupné z URL: <<http://www1.lf1.cuni.cz/udmp/web2/cell/els/els.htm>> [cit. 5. 2. 2020].
3. Alberts, B. *et al.* Vnitrobuněčné oddíly a transport. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky* 447–480 (Espero Publishing, 2005).
4. Xu, H. & Ren, D. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* **77**, 57–80 (2015).
5. Lodish, H. *et al.* Organelles of the Eukaryotic Cell. *Molecular Cell Biology* 168–185 (W. H. Freeman, 2000).
6. Sardiello, M. *et al.* A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**, 473–477 (2009).
7. Kodíček, M., Valentová, O. & Hynek, R. Transport částic přes biologickou membránu. *Biochemie - chemický pohled na biologický svět* 163–169 (VŠCHT, 2015).
8. Platt, F., M. & Walkley, S., U. *Lysosomal Disorders of the Brain: Recent Advances in Molecular and Cellular Pathogenesis and Treatment*. (Oxford University Press, 2004).
9. Mokhtariye, A., Hagh-Nazari, L., Varasteh, A. & Keyfi, F. Diagnostic methods for Lysosomal Storage Disease. *Rep Biochem Mol Biol* **7**, 119–128 (2019).
10. Poupětová, H. *et al.* The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations. *J Inherit Metab Dis* **33**, 387–396 (2010).
11. Remuzzi, G. & Garattini, S. Rare diseases: what's next? *Lancet* **371**, 1978–1979 (2008).
12. Sun, A. Lysosomal storage disease overview. *Ann Transl Med* **6**, 476–490 (2018).
13. Walkley, S. U. Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex? *J Inherit Metab Dis* **32**, 181–189 (2009).
14. Giugliani, R. The Mucopolysaccharidoses. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide* (eds. Mehta, A. & Winchester, B.) 94–100 (Wiley-Blackwell, 2012).

15. Coutinho, M. F., Lacerda, L. & Alves, S. Glycosaminoglycan Storage Disorders: A Review. *Biochem Res Int* **2012**, 471325 (2012).
16. Kumari, A. Mucopolysaccharidoses. *Sweet Biochemistry* 75–84 (Academic Press, 2018).
17. Zhang, F., Zhang, Z. & Linhardt, R. J. Glycosaminoglycans. *Handbook of Glycomics* (eds. Cummings, R. D. & Pierce, J. M.) 59–80 (Academic Press, 2010).
18. Liu, Q., Chen, G. & Chen, H. Chemical synthesis of glycosaminoglycan-mimetic polymers. *Polym Chem* **10**, 164–171 (2018).
19. Kodíček, M., Valentová, O. & Hynek, R. Přehled nejvýznamnějších polysacharidů. *Biochemie - chemický pohled na biologický svět* 294–298 (VŠCHT, 2015).
20. Neufeld, E. F. & Muenzer, J. The mucopolysaccharidoses. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease* 3421–3452 (McGraw-Hill, 2001).
21. Winchester, B. Classification of Lysosomal Storage Diseases. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide* (eds. Mehta, A. & Winchester, B.) 37–47 (Wiley-Blackwell, 2012).
22. Tatapudi, R., Gunashekhar, M. & Raju, P. S. Mucopolysaccharidosis type I Hurler-Scheie syndrome: A rare case report. *Contemp Clin Dent* **2**, 66–68 (2011).
23. Montañó, A. M. *et al.* Clinical course of Sly syndrome (mucopolysaccharidosis type VII). *J Med Genet* **53**, 403–418 (2016).
24. Valstar, M. J. *et al.* Mucopolysaccharidosis type IIIA: clinical spectrum and genotype-phenotype correlations. *Ann Neurol* **68**, 876–887 (2010).
25. Shapiro, E. G. *et al.* A Prospective Natural History Study of Mucopolysaccharidosis Type IIIA. *J Pediatr* **170**, 278–287 (2016).
26. Tomatsu, S. *et al.* Morquio A Syndrome: Diagnosis and Current and Future Therapies. *Pediatr Endocrinol Rev* **12**, 141–151 (2014).
27. Montañó, A. M., Tomatsu, S., Brusius, A., Smith, M. & Orii, T. Growth charts for patients affected with Morquio A disease. *Am J Med Genet A* **146A**, 1286–1295 (2008).
28. Natowicz, M. R. *et al.* Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N Engl J Med* **335**, 1029–1033 (1996).
29. Kiykim, E. *et al.* Screening Mucopolysaccharidosis Type IX in Patients with Juvenile Idiopathic Arthritis. *JIMD Rep* **25**, 21–24 (2015).
30. Wraith, J., Edmond & Beck, M. Clinical Aspects and Clinical Diagnosis. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide* (eds. Mehta, A. & Winchester, B.) 13–19 (Wiley-Blackwell, 2012).

31. Winchester, B. Laboratory Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide* (eds. Mehta, A. & Winchester, B.) 20–27 (Wiley-Blackwell, 2012).
32. Malinová, V. & Honzík, T. Lysosomální onemocnění - současné možnosti diagnostiky a terapie. *Pediatric pro praxi* **14**, 99–103 (2013).
33. Filocamo, M. & Morrone, A. Lysosomal storage disorders: molecular basis and laboratory testing. *Hum Genomics* **5**, 156–169 (2011).
34. Parenti, G., Pignata, C., Vajro, P. & Salerno, M. New strategies for the treatment of lysosomal storage diseases (review). *Int J Mol Med* **31**, 11–20 (2013).
35. Beck, M. Treatment strategies for lysosomal storage disorders. *Dev Med Child Neurol* **60**, 13–18 (2018).
36. Futerman, A. H. & van Meer, G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 554–565 (2004).
37. Ran, F. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat protoc* **8**, 2281–308 (2013).
38. Deveau, H., Garneau, J. E. & Moineau, S. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu Rev Microbiol* **64**, 475–493 (2010).
39. Zhang, F., Wen, Y. & Guo, X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet* **23**, R40–46 (2014).
40. Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F. & Nelson, K. E. A Guild of 45 CRISPR-associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Comput Biol* **1**, 474–483 (2005).
41. Makarova, K. S. *et al.* Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **9**, 467–477 (2011).
42. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
43. Mali, P. *et al.* RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826 (2013).
44. Razzaq, A. & Masood, A. CRISPR/Cas9 System: A Breakthrough in Genome Editing. *Mol Biol* **7**, 168–174 (2018).
45. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
46. Lee, H., Yoon, D. E. & Kim, K. Genome editing methods in animal models. *Anim Cells Syst (Seoul)* **24**, 8–16 (2020).

47. Luther, D. C., Lee, Y. W., Nagaraj, H., Scaletti, F. & Rotello, V. M. Delivery Approaches for CRISPR/Cas9 Therapeutics In Vivo: Advances and Challenges. *Expert Opin Drug Deliv* **15**, 905–913 (2018).
48. Lino, C. A., Harper, J. C., Carney, J. P. & Timlin, J. A. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches. *Drug Deliv* **25**, 1234–1257 (2018).
49. Santos, R. & Amaral, O. Advances in Sphingolipidoses: CRISPR-Cas9 Editing as an Option for Modelling and Therapy. *Int J Mol Sci* **20**, 5897 (2019).
50. Lawson, C. A. & Martin, D. R. Animal models of GM2 gangliosidosis: utility and limitations. *Appl Clin Genet* **9**, 111–120 (2016).
51. Eaton, S. L. *et al.* CRISPR/Cas9 mediated generation of an ovine model for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1 disease). *Sci Rep* **9**, 1–8 (2019).
52. Borger, D. K. *et al.* Induced pluripotent stem cell models of lysosomal storage disorders. *Dis Model Mech* **10**, 691–704 (2017).
53. Akutsu, H., Cowan, C. A. & Melton, D. Human embryonic stem cells. *Meth Enzymol* **418**, 78–92 (2006).
54. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
55. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
56. Sommer, C. A. *et al.* Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* **27**, 543–549 (2009).
57. Kiskinis, E. & Eggan, K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest* **120**, 51–59 (2010).
58. Huang, H.-P., Chuang, C.-Y. & Kuo, H.-C. Induced pluripotent stem cell technology for disease modeling and drug screening with emphasis on lysosomal storage diseases. *Stem Cell Res Ther* **3**, 34 (2012).
59. Saha, K. & Jaenisch, R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* **5**, 584–595 (2009).
60. Diecke, S., Jung, S. M., Lee, J. & Ju, J. H. Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *Korean J Intern Med* **29**, 547–557 (2014).
61. Jevons, L. A., Houghton, F. D. & Tare, R. S. Augmentation of musculoskeletal regeneration: role for pluripotent stem cells. *Regen Med* **13**, 189–206 (2018).

62. Oh, Y. & Jang, J. Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells by Transcription Factors. *Mol Cells* **42**, 200–209 (2019).
63. Bassett, A. R. Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models. *Mamm Genome* **28**, 348–364 (2017).
64. Daheron, L. & D'Souza, S. Blood - SeV derived fibroblast generated iPSCs. *StemBook* (Harvard Stem Cell Institute, 2008).
65. Mok, A., Cao, H. & Hegele, R. Genomic basis of mucopolysaccharidosis type IIID (MIM 252940) revealed by sequencing of GNS encoding N-acetylglucosamine-6-sulfatase. *Genomics* **81**, 1–5 (2003).
66. Tomatsu, S. *et al.* Mucopolysaccharidosis IVA: identification of mutations and methylation study in GALNS gene. *J Med Genet* **41**, 98 (2004).
67. Malekpour, N., Vakili, R. & Hamzehloie, T. Mutational analysis of ARSB gene in mucopolysaccharidosis type VI: identification of three novel mutations in Iranian patients. *Iran J Basic Med Sci* **21**, 950–956 (2018).
68. Hartree, E. F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Anal Biochem* **48**, 422–427 (1972).
69. Wenger, D. A. & Williams, C. Screening for Lysosomal Disorders. *Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics* 587–617 (Wiley-Liss, 1991).
70. van Diggelen, O. P. *et al.* A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). *Clin Chim Acta* **187**, 131–139 (1990).
71. Suzuki, K. Enzymic diagnosis of sphingolipidoses. *Meth Enzymol* **50**, 456–488 (1978).
72. Suchorska, W. M., Augustyniak, E., Richter, M. & Trzeciak, T. Comparison of Four Protocols to Generate Chondrocyte-Like Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Stem Cell Rev* **13**, 299–308 (2017).
73. Dusseldorf, I. Bradford Assay with RotiQuant (ROTH). *Protocols.io* [online], Dostupné z URL: <<https://www.protocols.io/view/bradford-assay-with-rotiquant-roth-8gghttw>> [cit. 2. 5. 2020].
74. Coulson, T. V. & Gesteira, T. Dimethylmethylene Blue Assay (DMMB). *BIO-PROTOCOL* **4**, 1236 (2014).